



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE
FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS**

**“Determinación de moléculas relacionadas con la inflamación y neurodegeneración en un
modelo de microinyección de oligómeros de A β ”**

T E S I S

Que presenta

M. en C. Danira Toral Rios

Para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS

En la especialidad de
Neurobiología Celular y Molecular

Directores de la Tesis:

Dr. Benjamín Florán Garduño

Dra. Victoria Campos Peña

Ciudad de México

Abril 2021

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), y en el Laboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”.

Durante la realización del proyecto, se contó con la asesoría de los siguientes Doctores en Ciencias, a quienes agradezco su apoyo: Dra. María Eugenia del Carmen Mendoza Garrido y Dr. Ismael Jiménez Estrada del Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias, así como del Dr. Marco Antonio Meraz Ríos del Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV-IPN y de la Dra. Gohar Gevorkian Markosian del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

De manera particular, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el otorgamiento de una beca para estudios de doctorado (no. 254288), para realizar el presente trabajo de tesis durante el período 2012-2016.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis Dra. Victoria Campos Peña y Dr. Benjamín Florán Garduño, por acompañarme en este largo camino recorrido, compartiendo su experiencia y moldeando el proyecto maratónico que emprendimos. Gracias por sus consejos académicos y personales.

De la misma forma, agradezco a mis asesores de tesis, por la paciencia y aportaciones al proyecto: Dra. María Eugenia del Carmen Mendoza Garrido, Dra. Gohar Gevorkian Markosian, Dr. Ismael Jiménez Estrada y Dr. Marco Antonio Meraz Ríos.

De manera especial quisiera agradecer al Dr. Rafael Gutiérrez Aguilar (CINVESTAV SEDE SUR), para realizar en su laboratorio mis últimos experimentos en cultivo celular, que fueron cruciales para la publicación de mi artículo. Además, agradezco al Dr. Gutiérrez por las revisiones y observaciones valiosas que realizó durante el proceso de publicación del artículo. A su técnico Dra. Gisela Gómez Lira por la realización de cultivos celulares, quién además siempre mostró un grato apoyo hacia mi persona.

A la Dra, Gohar Gevorkian (UNAM) por recibirme en su laboratorio, para aprender a realizar la cirugía estereotáxica en roedores y permitirme aprender la técnica de preparación de oligómeros con el Biol. Gonzálo Acero, a quién también agradezco su apoyo.

A la Dra. Elizabeth Ruiz Sánchez (INNN) por su amistad y apoyo para la estandarización de técnicas de Biología Molecular. Al Dr. Genaro Patiño López (HIFGM), por su ayuda en la obtención de mis últimas fotografías de microscopía confocal. Al Dr. Porfirio Nava (CINVESTAV) por sus consejos y préstamo de anticuerpos para poder abordar la vía JAK/STAT. Al Dr. Juan Carlos León y Dr. Rogelio Hernández Pando (INCMNSZ), por su apoyo en la realización de la técnica de microscopía electrónica.

A mis compañeros que me auxiliaron al desarrollo de alguna de mis técnicas y brindaron su amistad: Biol. Fernando Becerril, Dra. Monserrat Flores, Dr. Cesar Gabriel Tóriz. Así como a mis compañeros del INNN, por los gratos momentos y su apoyo incondicional: Carol, Yahir, Karlita, Pavel, Ekaterina, Emma, Daniela y Pedro.

Finalmente, agradezco a mis directoras de la Prepa UP Campus Yaocalli, por brindarme la oportunidad de impartir clases y la flexibilidad de tiempo que brindaron para terminar mis experimentos. A mis amigas Carinthia y Marieta, las llevo en el corazón.

DEDICATORIAS

El presente proyecto lo dedico con especial cariño a las personas, que sin duda fueron un pilar para el desarrollo y conclusión del proyecto. Mis agradecimientos infinitos para ellos.

A mis padres

Maria de Lourdes Rios Climaco y Antelmo Toral Rios, quiénes me han apoyado con tanto amor, confiando en que sacaría adelante este proyecto. Gracias por enseñarme que el trabajo bien realizado, es la base para concretar mis sueños. Los amo y pido a Dios que me permita retribuirles todo su esfuerzo.

A mi esposo

Octavio Ramos Espinosa, mi fiel compañero, gracias porque llegaste a cambiar muchas de las percepciones que tenía en la vida. Gracias por impulsarme cuando estuve a punto de tirar la toalla, por compartir y apoyar cada una de mis ocurrencias y proyectos que emprendo. Te amo!

A mis hermanas

Diana Astrid y Denisse Toral Rios por todas sus energías, su aliento, su cariño y tantas horas de diversión.

A mis abuelitos

Oliva Climaco Matus y Victor Rios Peto, por fin se los cumplí!! Gracias por todo su apoyo y buenos deseos. Gracias por ser mi ejemplo de humildad.

A mi gran tutora y amiga

Dra. Victoria Campos Peña, ya casi 12 años de conocernos. Gracias por tu cariño, por tu grata amistad y tu guía para concluir el proyecto. Este éxito es tuyo!! Deseo de todo corazón que vengan muchos proyectos más para ti y que se vea reflejado con nuevas publicaciones. Te lo mereces por que eres una persona que no se rinde, que trabaja bien y con mucha ética profesional. Bendiciones hoy y siempre.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	4
ÍNDICE DE FIGURAS	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 Epidemiología de la Enfermedad de Alzheimer	6
1.2 Enfermedad de Alzheimer	6
1.2.1 Generalidades	6
1.2.2 Clasificación	8
1.2.3 Diagnóstico	9
1.3 Hipótesis amiloidea relacionada al desarrollo de la EA	10
1.3.1 Síntesis del péptido A β	10
1.3.2 Agregación de A β	11
1.3.3 Eliminación del péptido A β	13
1.3.4 Mecanismos de neurotoxicidad mediados por A β	14
1.3.5 Inflamación mediada por A β	16
1.3.6 El papel de las citocinas y su relación con el péptido A β	17
1.3.6.1 Factor de necrosis tumoral α	18
1.3.6.2 Ciclooxigenasa 2	18
1.3.6.3 Interleucina 1	19
1.3.6.4 Interleucina 6	20
1.3.6.5 Interleucina 10	20
1.3.7 Vías de señalización involucradas en la inflamación mediada por el péptido A β	21
1.3.7.1 La vía JAK/STAT y la neurotoxicidad mediada por A β	23
2. JUSTIFICACIÓN	29
3. OBJETIVOS	30
3.1 GENERAL	30
3.2 PARTICULARES	30

4.	HIPÓTESIS	31
5.	MÉTODOS	32
5.1	Preparación e identificación de oligómeros del péptido A β .	32
5.2	Modelo Animal.	32
5.3	Sacrificio de animales	33
5.4	Análisis ultraestructural por Microscopía Electrónica de Transmisión.	34
5.5	Inmunohistoquímica.	34
5.6	Inmunofluorescencia.	35
5.7	Tinción con Fluorojade B.	35
5.8	Conteo de neuronas maduras y degeneradas.	36
5.9	Cuantificación de citocinas por ensayo Multiplex.	36
5.10	Evaluación de la expresión génica por RT- qPCR.	37
5.11	Modelo celular de inhibición de JAK2/STAT3	38
5.12	Análisis estadístico	39
6.	RESULTADOS	40
6.1	Identificación de oligómeros del péptido A β .	40
6.2	Degeneración neuronal mediada por A β O.	40
6.3	Respuesta celular aguda y crónica mediada por A β O	44
6.4	Análisis Ultraestructural	48
6.5	Inflamación molecular mediada por A β O.	53
6.6	A β O promueven la expresión de STAT3 en células gliales.	55
6.7	Relación entre la expresión de STAT3 en células gliales mediada por A β O y la muerte neuronal.	59
7.	DISCUSIÓN	67
8.	CONCLUSIONES	78
9.	PERSPECTIVAS	79
10.	BIBLIOGRAFÍA	80
11.	ANEXOS	89
	Anexo I. Artículo original publicado derivado del proyecto de Doctorado	89

Activation of STAT3 Regulates Reactive Astrogliosis and Neuronal Death Induced by A β O
Neurotoxicity

Anexo II. Carátulas de artículos y capítulos de libro publicados _____	118
GSK3 β and Tau Protein in Alzheimer's Disease and Epilepsy_____	118
Metabolic syndrome as a risk factor for Alzheimer's disease: is A β a crucial factor in both pathologies?_____	119
Oxidative Stress, Metabolic Syndrome and Alzheimer's Disease_____	120
Evaluation of inflammation-related genes polymorphisms in Mexican with Alzheimer's disease: a pilot study_____	121
Early Onset Alzheimer's Disease and Oxidative Stress_____	122
Oxidative Stress and Metabolic Syndrome: Cause or Consequence of Alzheimer's Disease?_____	123
Inflammatory process in Alzheimer's Disease_____	124
Anexo III. Carátula de artículo en proceso de publicación _____	125
Increased oxidative stress contributes to enhance brain amyloidogenesis and blunts energy metabolism in sucrose-fed rat: Effect of AMPK activation_____	125

ABREVIATURAS

EA	Enfermedad de Alzheimer	TFGβ	Factor de crecimiento tumoral β
PN	Placas Neuríticas	iNOs	Oxido nítrico sintetasa inducible
MNF	Marañas neurofibrilares	PGS	Prostaglandinas
Aβ	Amiloide beta	SNC	Sistema Nervioso Central
FAD	EA de inicio temprano	BACE1	Enzima β -secretasa
LOAD	EA de inicio tardío	Aβ40	Amiloide 1-40
IRM	Imagen por resonancia magnética	Aβ42	Amiloide 1-42
	Apolipoproteína E	LPS	Lipopolisacárido
ApoE	Aminoácidos	DTA	Demencia Tipo Alzheimer
aa	Estudios de asociación de Genoma Completo	AIMs	Marcadores de ancestría
GWAS	Completo	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SNP	Variante de un solo nucleótido	OR	Razón de momios
EHW	Equilibrio Hardy-Weinberg	GFAP	Proteína Fibrilar Ácida
LD	Desequilibrio de ligamiento	NeuN	Proteína Nuclear Neuronal
IL-1 α, β	Interleucina 1 a o b	Iba1	Molécula Adaptadora de Calcio 1
IL-6	Interleucina 6	STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3,
IL-10	Interleucina 10		PCR cuantitativa
TNFα	Factor de Necrosis Tumoral α	qPCR	PCR cuantitativa
COX-2	Ciclooxigenasa 2	RT-PCR	Retrotranscripción inversa acoplada a PCR
APP	Proteína precursora de Amiloide	FJB	Fluoróforo B
α,β-APPs	Fragmento soluble APP α o β	IHC	Inmunohistoquímica
		RNAm	RNA mensajero
AβO	Oligómeros de A β	JAK2	Janus cinasa 2
LRP	Receptor de lipoproteínas de baja Densidad	S o SS	Solución salina
		SEM	Error Estándar de la Media
NMDAR	Receptor a N-metil-D-aspartato	BSA	Albúmina de suero bovino
α7nChR	Receptor α 7 nicotínico a acetilcolina		
RAGE	Receptor de productos de Glicosilación avanzada		
ROS	Glicosilación avanzada		
TLR	Especies reactivas de oxígeno		
	Receptor tipo Toll		
BHE	Barrera Hematoencefálica		
GD	Giro dentado		

RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la demencia senil más frecuente, la cual se caracteriza clínicamente por la pérdida gradual de la memoria. A nivel histopatológico, el cerebro de los pacientes con la EA presenta dos lesiones, las Placas Neuríticas (PN) y Marañas Neurofibrilares (MNF). Las PN son agregados extracelulares del péptido A β , que en los últimos años han llamado la atención por la amplia relación que mantienen con la activación prematura de células de la microglia y astrocitos, en la patología. En particular, las formas oligoméricas de A β (A β O) promueven un perfil inflamatorio, caracterizado por la producción de una serie de mediadores moleculares como las citocinas TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-10.

La inflamación juega un papel importante para inducir la fagocitosis de las A β O por parte de la microglia y astrocitos, así como para permitir la regeneración de axones. Sin embargo, la inflamación crónica en el Sistema Nervioso Central (SNC) conduce a la neurodegeneración. Por esta razón, resulta importante identificar los mediadores y las vías de señalización implicadas en la regulación de las respuestas pro- y anti-inflamatorias.

Una vía de señalización que modula la inflamación en el SNC es la vía JAK/STAT. Adicionalmente, la vía participa en la regulación de las sinapsis, la plasticidad, la supervivencia celular y la neuroprotección. Sin embargo, se ha propuesto que alteraciones en la vía, podrían favorecer el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, una de ellas es la EA. En particular, los agregados de A β pueden favorecer un incremento de activación de la vía JAK/STAT, promoviendo particularmente la activación del factor de transcripción STAT3, con lo cual se podría favorecer la apoptosis en neuronas. Contrario a esto, otros estudios han reportado que A β promueve una disminución de la expresión de STAT3 en neuronas, impactando a la supervivencia celular. De la misma forma, se ha observado que el A β puede estimular la expresión de STAT3 glial.

El estudio de la expresión de la vía JAK/STAT3 en relación con A β O resulta importante, ya que su activación, conduciría a un estado inflamatorio exacerbado, desfavorable para la supervivencia neuronal. Tomando en cuenta lo anterior, en el presente estudio se diseñó un modelo de microinyección de A β O en la región de CA1 del hipocampo de rata, en el que se realizó un

seguimiento temporal de la activación glial con la finalidad de establecer una relación entre la producción de mediadores moleculares y la muerte neuronal. Los resultados del modelo sugieren que las formas oligoméricas de A β podrían mediar una neurotoxicidad indirecta, al inducir la expresión de STAT3 y activación de células gliales. Los mediadores que probablemente podrían favorecer la expresión de STAT3 en el modelo experimental son la IL-6 e IL-10. Nuestros resultados sugieren que la inhibición de STAT3 en las células gliales, principalmente en astrocitos, resulta una estrategia terapéutica interesante para modular la agregación de A β , la inflamación y el deterioro cognitivo en la EA.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most frequent senile dementia, characterized clinically by progressive memory loss. AD neuropathological hallmarks are Neuritic Plaques (NPs) and Neurofibrillary Tangles (NFT). NPs are extracellular aggregates of A β peptide, which in recent years has been studied due to strong correlation with premature activation of microglia cells and astrocytes in AD. Particularly, A β oligomers (A β O) promote a potent inflammatory profile, favoring several pathway signaling activation and the production of inflammation mediators, such as cytokines (TNF- α , IL-1, IL-6, and IL-10). Inflammation plays an important role to induce A β O phagocytosis by microglia and astrocytes, also to allow axon regeneration. Nevertheless, chronic inflammation in Central Nervous System (CNS) conducts to neurodegeneration. For this reason, is necessary to identify the specific mediators and signaling pathways involved in maintaining the balance between proinflammatory and antiinflammatory responses.

One signaling pathway altered in AD patients that could exert pleiotropic functions is the JAK/STAT pathway, to mention some of the physiological functions in CNS are synapsis regulation, plasticity, cell survival, neuroprotection. However, it has been reported JAK/STAT pathways alterations in some neurodegenerative diseases, one of them is AD. Particularly, the A β aggregates have the ability of activate the STAT3 transcription factor and favor apoptosis. Other studies have reported the contrary, A β decreases STAT3 expression in neurons, but stimulate glial STAT3 expression.

In summary, study the of JAK/STAT3 pathway expression in relation with A β O results interesting because the pathway activation would conduct to an inflammatory exacerbated state unfavorable to neuron survival. Taking into account this, we design a model of A β O microinjection, conducting a temporarily monitoring glial activation to establish a relation between molecular mediators' production and neuronal death. Our results suggest that A β O could mediate indirect neurotoxicity by inducing glial cell activation and STAT3 expression; this last could be favored by the molecular mediators IL-6 and IL-10. The present results correlate with recent studies, in where it has been identified glial STAT3 inhibition (mainly in astrocytes), as an interesting therapeutic strategy to modulate A β aggregation, inflammation and cognitive impairment in AD.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. <u>Alteraciones macroscópicas en la EA</u>	7
2. <u>Alteraciones microscópicas en la EA</u>	8
3. <u>Procesamiento de APP</u>	11
4. <u>Agregación de Aβ</u>	13
5. <u>Mecanismos de toxicidad de oligómeros de Aβ</u>	15
6. <u>Inflamación mediada por Aβ</u>	17
7. <u>Vía de señalización JAK/STAT</u>	24
8. <u>Ensayo de inhibición de JAK2/STAT3 en cultivo celular</u>	38
9. <u>Identificación de oligómeros por microscopía electrónica de transmisión</u>	40
10. <u>Cuantificación de neuronas degeneradas</u>	42
11. <u>Cuantificación de neuronas maduras</u>	43
12. <u>Respuesta celular aguda mediada por AβO</u>	45
13. <u>Respuesta celular crónica mediada por AβO</u>	47
14. <u>Análisis ultraestructural de alteraciones agudas</u>	49
15. <u>Análisis ultraestructural de alteraciones crónicas</u>	51
16. <u>Alteraciones crónicas ultraestructurales adicionales</u>	52
17. <u>Cuantificación de citocinas y expresión de IL-6</u>	54
18. <u>Expresión del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) en el hipocampo</u>	57
19. <u>Expresión de STAT3 en astrocitos y neuronas</u>	58
20. <u>Inhibición de JAK2 con 25 μM de AG490</u>	60
21. <u>Inhibición de JAK2 con 50 μM de AG490</u>	61
22. <u>Efectos del inhibidor Stattic en cultivo primario de hipocampo de rata</u>	63
23. <u>Ensayo de inhibición con Stattic 5 μM en cultivo primario de hipocampo</u>	65

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología de la Enfermedad de Alzheimer

Con el progreso acelerado en la esperanza de vida desde la última mitad del siglo pasado, las enfermedades crónico-degenerativas, así como sus complicaciones, se han hecho más comunes en la población global. Entre estas enfermedades se incluye a la Demencia, cuya prevalencia incrementa exponencialmente desde el 2-3% en aquellos individuos de 70-75 años, hasta alcanzar el 20-25% en individuos con más de 85 años de edad. [1]. Otra proyección, indica que el número de personas afectadas por la demencia se duplicarán entre el 2020 y el 2040 [1].

La demencia se define como el desarrollo de múltiples déficits cognitivos que incluyen la pérdida de la memoria, déficit en la capacidad de lenguaje (afasia), alteraciones para realizar movimientos coordinados (apraxia) o responder a estímulos (agnosia); lo cual provoca una discapacidad general que impide que el paciente sea capaz de realizar las tareas de la vida cotidiana [2].

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia en países occidentales, y aproximadamente corresponde a cerca del 60% de los casos totales de demencias [3]. Por esto, el estudio de la enfermedad y su caracterización son sumamente importantes para el futuro. En México, la prevalencia de la EA es de 7.3% y se estima que para el 2050, 3.5 millones de personas se verán afectadas, generando de esta manera un problema grave de salud pública en el futuro [4].

1.2 Enfermedad de Alzheimer

En 1901 el patólogo y psiquiatra alemán Alois Alzheimer, fue el primero en describir la enfermedad como una patología inusual con atrofia de la corteza cerebral en una paciente. Clínicamente el paciente presentó pérdida de memoria, desorientación y alucinaciones.

1.2.1 Generalidades

Como se mencionó previamente, la EA es la causa más frecuente de demencia en la población de 50-60 años. Sus etapas iniciales se caracterizan por la disminución en la percepción espacial, así como desorientación en tiempo y espacio (Fig. 3). En las etapas tardías se presenta un aumento en el tono muscular, desinhibición emocional notable y el deterioro de la personalidad normal del

individuo. Otros datos clínicos comunes son la pérdida del control de esfínteres, disminución de peso y, finalmente, el paciente termina en estado vegetativo [5].

Macroscópicamente en el cerebro de un individuo con EA, se observa una atrofia simétrica y una disminución de la masa cerebral en áreas corticales (atrofia de todos los lóbulos, aunque generalmente el más afectado es el temporal). La pérdida de tejido en el cerebro de los pacientes, provoca el ensanchamiento de los ventrículos laterales [6]. Particularmente, la dilatación del asta temporal evidencia la gran atrofia del hipocampo, el cual, se encuentra adyacente a esta estructura (Figura 1), mientras que la corteza motora primaria y visual se conservan prácticamente intactas [7].

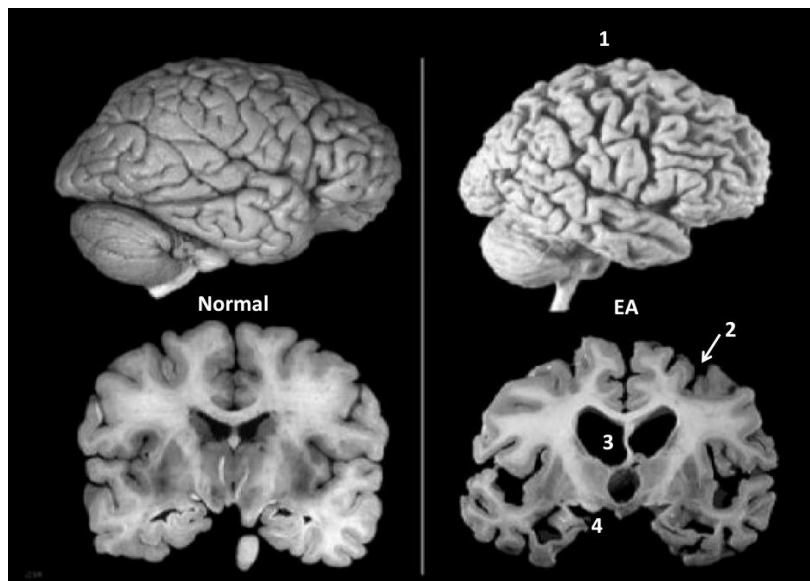


Figura 1. Alteraciones macroscópicas en la EA. A la izquierda se presenta un cerebro de adulto mayor clínicamente sano y a la derecha el de un paciente con EA avanzado. En el cerebro del paciente se denotan las siguientes alteraciones: 1: atrofia de la corteza cerebral, 2: ensanchamiento de surcos, 3: ensanchamiento de ventrículos laterales y 4: atrofia hipocampal [8].

En un estudio histológico post-mortem del tejido cerebral de pacientes con EA, es posible observar la presencia de dos lesiones neuropatológicas que acompañan la pérdida sináptica y muerte neuronal. Estas son las Placas Neuríticas (PN) y las Marañas Neurofibrilares (MNF).

Las MNF (Figura 2A) son agregados intracelulares de la proteína tau en un estado principalmente hiperfosforilado. Dicha proteína regula de manera fisiológica la dinámica de los microtúbulos que

son la base del transporte axonal de vesículas y organelos [9]. Las MNF correlacionan con la severidad y progresión de la demencia observada en la EA [10].

Las PN (Figura 2B) son agregados extracelulares del péptido amiloide beta ($A\beta$) y pueden estar rodeadas por astrocitos reactivos y células de la microglia. Las PN son lesiones presentes en la EA. Sin embargo, podemos encontrar depósitos de amiloide en otras patologías, así como en sujetos mayores sin demencia [11].

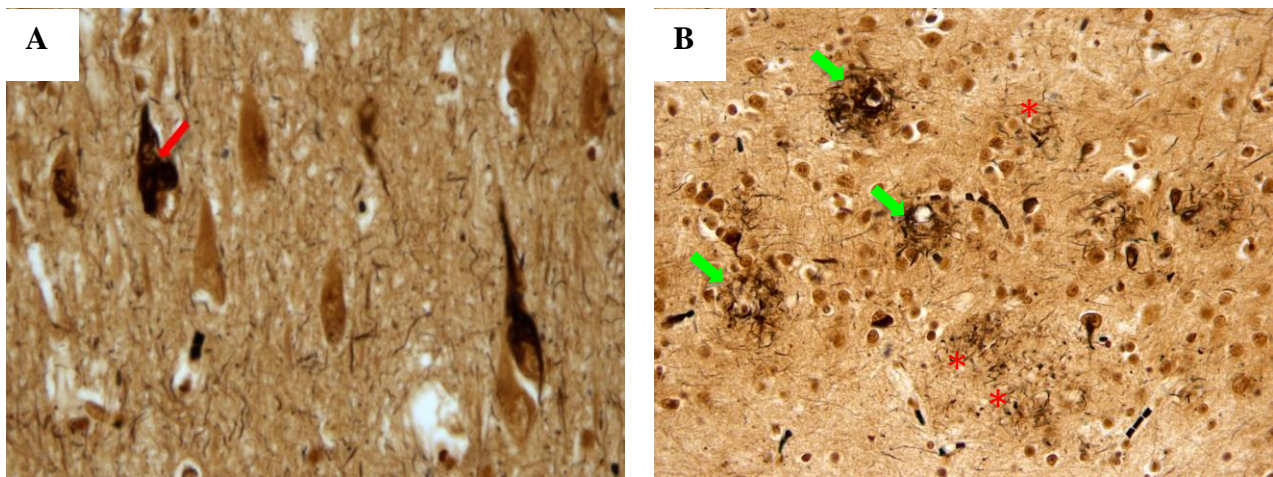


Figura 2. Alteraciones microscópicas en la EA. Las imágenes fueron obtenidas a partir de cortes histológicos de tejido de un paciente con EA, que fueron teñidos utilizando la técnica de impregnación argéntica (Bielschowsky) A: Con una flecha roja, se marca la presencia de una MNF dentro del citoplasma de una neurona. B: En flechas verdes se identifica la presencia de PN y con asteriscos rojos, algunos agregados difusos de amiloide (Campos-Peña V., 2008).

1.2.2 Clasificación

De acuerdo a su etiología, la EA puede clasificarse en dos grupos, esta clasificación toma como criterios la edad de presentación de los síntomas y la posible relación con una historia familiar. Estos grupos son:

- *EA de inicio temprano o familiar (FAD)* (5-10%), que se relaciona con una herencia familiar de tipo autosómica dominante, ocurre cuando la persona tiene entre 30 y 65 años. Este tipo de enfermedad está asociada con la presencia de mutaciones en proteínas específicas en tres genes causales: APP, PSEN1 y PSEN2. La presencia de mutaciones en estos genes, acelera la evolución de la enfermedad [12].

- *EA de inicio tardío (LOAD) (90-95%)*, son casos de tipo esporádico que se presentan después de los 65 años. Se desconoce la causa, pero se asocian a factores genéticos, ambientales y nutricionales [13].

1.2.3 Diagnóstico

El diagnóstico de Alzheimer se realiza, tomando en cuenta los siguientes criterios:

1) Historia Clínica: en la cual se buscan antecedentes familiares del paciente y síntomas de demencia, considerando que hubiese familiares afectados.

2) Examen Neuropsicológico: Existen diferentes criterios para establecer el diagnóstico de la demencia; los más utilizados son los incluidos en la prueba del grupo DSM-V la APA [14] y los del NINCDS-ADRDA [15]. Para evaluar las demencias se pueden utilizar gran número de pruebas de tamizaje, entre los que destaca el Mini Mental State Examination (MMSE), que evalúa la orientación, el registro de información, la atención y el cálculo; el recuerdo, el lenguaje y la construcción [16].

3) Estudios de Imagen:

Los estudios de imagen de gabinete que ayudan a valorar a un paciente con sospecha de EA y su propósito es el soporte diagnóstico. El estudio de elección en esta modalidad es la Imagen por Resonancia Magnética (IRM). Los hallazgos estructurales de la EA en IRM incluyen atrofia generalizada y focal, con mayor dilatación de los surcos y mayor extensión de los ventrículos. En general, estos hallazgos son poco específicos. La lesión focal más característica es la reducción del volumen hipocampal o atrofia del lóbulo temporal [17].

4) Estudio histopatológico post mortem: Sigue considerándose como el único diagnóstico definitivo de EA. Se realiza mediante el análisis en microscopía del tejido cerebral, poniendo especial atención en las zonas hipocampales y de isocorteza, sitios donde se observa la presencia de PN y MNF.

1.3 Hipótesis amiloidea relacionada al desarrollo de la EA

En 1992, Hardy y Higgins plantearon que el péptido derivado del procesamiento de APP, promueve la neurotoxicidad, mediando tanto la formación de MNF y la muerte celular [18].

1.3.1 Síntesis del péptido A β

El péptido A β , se genera a partir del procesamiento de una glicoproteína transmembranal de 770 aa, denominada Proteína Precursora del Amiloide (APP). Esta proteína se localiza en: la membrana plasmática, trans-Golgi del retículo endoplásmico, endosomas y la membrana mitocondrial. APP presenta 3 dominios: N'-terminal (extracelular), A β (transmembranal) y C'-terminal intracelular. Dentro de sus funciones, se relaciona con procesos de proliferación y adhesión celular, y fuertemente ligada al desarrollo y plasticidad neuronal[19]. APP es procesada mediante dos vías (Figura 3):

- **No amiloidogénica:** APP es cortada entre los aa 687 y 688, del dominio A β por la enzima α -secretasa. Como resultado de este corte, se libera el extremo extracelular de la proteína que se denomina α PPAs. Anclado a la membrana, deja el fragmento C83, que es escindido por el complejo multiproteico de la γ -secretasa, produciendo el péptido P3, el cual es pequeño y soluble [20].
- **Amiloidogénica:** La β -secretasa corta la proteína en los aa 671 y 672, liberando el péptido β PPAs y dejando anclado a la membrana el fragmento C99 de la proteína. Este último es procesado por el complejo γ -secretasa, en los residuos 711-713, y así se pueden producir péptidos A β de 37-42 aa [21].

De manera fisiológica se ha descrito que el péptido A β pudiera llevar a cabo funciones importantes. En este sentido, se ha descrito que pudiera actuar como un péptido antimicrobiano natural, para favorecer el reconocimiento de patógenos por las células del sistema inmune como la microglia y los macrófagos. Al parecer la forma soluble del péptido A β , puede actuar en las neuronas pre-sinápticas promoviendo la liberación de neurotransmisores, así como la plasticidad sináptica y la consolidación de la memoria[22].

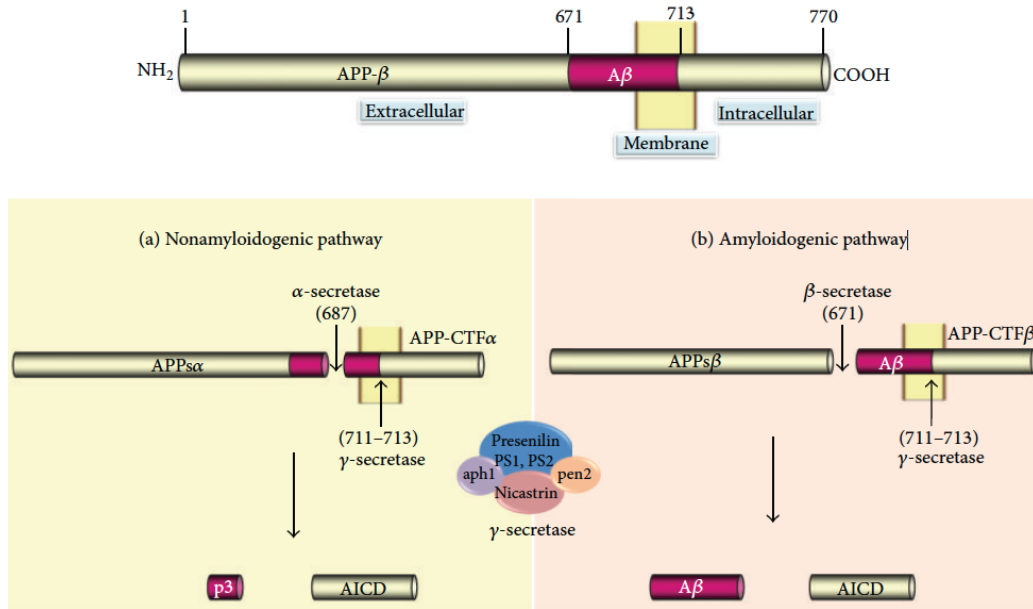


Figura 3. Procesamiento de APP. En la parte superior se observan los dominios de APP, entre ellos se resalta el péptido A β (671-713 aa). En la parte inferior izquierda, se presenta la vía no amiloidogénica mediante la cual APP es procesada por la α -secretasa y el complejo γ -secretasa, obteniéndose un péptido soluble conocido como p3. En la parte inferior se representa la vía amiloidogénica de la proteína, cuando es cortada por la β -secretasa y el complejo de la γ -secretasa, produciendo al péptido A β [23].

Sin embargo, en patologías como la Enfermedad de Alzheimer y la Angiopátia Cerebral Amiloidea, los péptidos A β de 40 y 42 aminoácidos, adquieren una estructura de hoja β plegada la cual da lugar a la formación de diferentes agregados que pudieran desencadenar múltiples alteraciones [24, 25].

1.3.2 Agregación de A β

En la secuencia del péptido A β se pueden identificar dos principales regiones el segmento amino (N)-terminal (aa 1-28) y el carboxilo (C)-terminal (aa 29-42). El primero es de naturaleza hidrofílica y el segundo hidrofóbica, convirtiendo al péptido en una molécula anfipática. En estudios *in vitro* se ha observado que A β mantiene una estructura de α -hélice en mezclas de alcohol-agua; sin embargo, en solución acuosa el péptido A β de 40 aa presenta una estructura tridimensional al azar, mientras que el péptido A β de 42 aa (A β 42), desarrolla una estructura β -plegada a pH fisiológico, lo cual facilita su agregación. Algunos estudios han identificado que los residuos de aa 24-28 son críticos para la formación de oligómeros, una de las formas más tóxicas del péptido [26].

Se han descrito diferentes factores que pudieran promover la agregación del péptido, uno de ellos es la exposición a metales como el Zn^{2+} , Ni^{2+} y Cu^{2+} [27, 28]. Por otro lado, la interacción de $A\beta$ mediante sus residuos hidrofóbicos y su afinidad por los componentes de la membrana plasmática, como colesterol y fosfolípido, representan un punto crucial para el inicio de la formación de oligómeros de $A\beta$ ($A\beta O$) [29]. Asimismo, el péptido $A\beta$ puede interactuar con el gangliósido GM1, presente en las balsas lipídicas, e induce la oligomerización de los monómeros de $A\beta$ [30].

El proceso de agregación (Figura 4), se inicia a partir de la formación de dímeros. En cuanto se unen más monómeros a la estructura, se pueden formar los oligómeros de bajo peso molecular (2-10 monómeros). Estos oligómeros son solubles, se han encontrado en LCR y homogenados de cerebro de pacientes con EA [26]. Además, se ha identificado que son capaces de formar estructuras tridimensionales denominadas β -barril, con los cuales podrían formar poros en la membrana que permiten se presenten condiciones tóxicas para la célula [31]. A partir de la unión de 10-250 unidades de monómeros, se formarán los oligómeros de alto peso molecular, los cuales también ejercen mecanismos de toxicidad a través de la membrana plasmática. Algunas de las estructuras perteneciente a este grupo son los globulómeros, los ligandos difusos derivados de amiloide y los dodecámeros ($A\beta^*56$)[32].

Si la agregación de estos oligómeros continua, se formarán protofibras, las cuales generan toxicidad y darán lugar a la formación de fibras de $A\beta$. Las fibras son agregados insolubles del péptido, presentan menor grado de toxicidad a diferencia de los oligómeros, pero son capaces de continuar favoreciendo el desarrollo de la patología[26].

Como previamente se mencionó, los péptidos que se encuentran presentes mayoritariamente en las PN son los de 40 y 42 aa, conociéndose que el péptido $A\beta 42$ tiene una mayor capacidad de agregarse. A este respecto, sustituciones de un solo aminoácido en la secuencia del péptido $A\beta 40$ por aminoácidos hidrofóbicos, han demostrado también aumentar su capacidad de agregación [33].

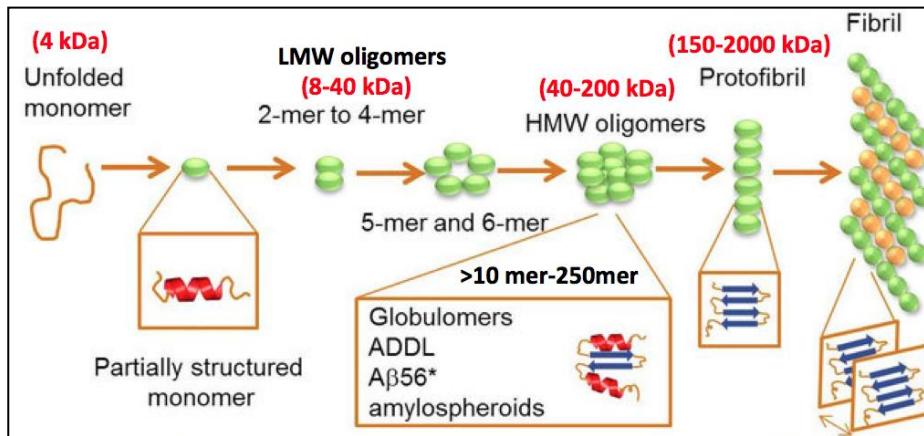


Figura 4. Agregación de A β . Los monómeros del péptido pueden unirse entre sí para formar estructuras esféricas denominadas oligómeros. A partir de 2-4 unidades se forman los oligómeros de bajo peso molecular (LMW) y posterior a la unión de 10-250 unidades de monómero se denominarán oligómeros de alto peso molecular (HMW). A pesar de que los oligómeros son estables, el proceso de agregación continua hasta dar lugar a la formación de fibras, las cuales se encuentran presentes en la placas neuríticas [34].

1.3.3 Eliminación del péptido A β

Existen diferentes mecanismos por los que el péptido A β y sus agregados podrían eliminarse con la finalidad de reducir sus efectos tóxicos en la EA. En el cerebro, las células gliales juegan un papel importante en la eliminación del A β . Estos tipos celulares, pueden eliminar formas solubles y fibrilares del péptido, y también son capaces de liberar enzimas proteolíticas que ayudan a su degradación. Las formas fibrilares de A β interactúan con el complejo de los receptores inmunes presente en la superficie de células gliales, iniciando diversas cascadas de señalización intracelular que estimulan la fagocitosis [35, 36].

Otro mecanismo de eliminación de A β es través de su depuración a la circulación sistémica a través de la barrera hematoencefálica (BHE), dicho transporte es mediado por el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP) o mediante su transporte a través de la glicoproteína P. Estos mecanismos son facilitados o inhibidos por su unión a proteínas de transporte como la ApoE, Apolipoproteína J o albúmina[35, 37].

Por último, diversas peptidasas y proteinasas pueden promover la degradación de A β . Su actividad se basa en su afinidad por A β , pH óptimo y localización celular. Las proteasas específicas que degradan A β pueden clasificarse por el tipo enzimático (por ejemplo, metaloproteasa, serina proteasa, aspartil proteasa, cisteína proteasa, treonina proteasa), por el estado de ensamblaje del

sustrato A β que hidrolizan (por ejemplo, peptidasas, oligopeptidasas) y por su localización subcelular (p. ej., espacio extracelular, retículo endoplásmico, endosomas, lisosomas, mitocondrias, citosol). En microglia, las principales enzimas intracelulares y extracelulares responsables de la proteólisis de A β son la neprilisina y la enzima degradadora de insulina [38].

1.3.4 Mecanismos de neurotoxicidad mediados por A β

En general, las PN están formadas por fibras de A β , que en el pasado se creía que eran las causantes de la neurodegeneración en la EA [39, 40]. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que diferentes oligómeros solubles, desde dímeros a dodecámeros, representan la forma de agregación de A β , más tóxica (Figura 5). De la misma forma, se ha sugerido una correlación inversa entre el tamaño de los oligómeros y la toxicidad [41].

Los oligómeros A β promueven alteraciones en la plasticidad sináptica, deterioro cognitivo y muerte celular a través de la interacción extracelular con diferentes receptores como el receptor a N-metil-d-aspartato (NMDAR), receptor de insulina, el del factor de crecimiento nervioso y el receptor Frizzled; este último representa el vínculo con la fosforilación de tau por la activación de la GSK3 β por el bloqueo de la vía Wnt/ β -catenina [24].

Los oligómeros favorecen la entrada masiva de Ca⁺² en la célula, promoviendo el estrés oxidativo y el daño mitocondrial, debido a que estimulan a los receptores NMDA y tienen la capacidad de formar poros de la membrana mediante la formación de estructuras en β -barril [42, 43].

La internalización y acumulación de oligómeros A β en los lisosomas se ha descrito como otro mecanismo que induce la muerte celular [44]. Algunos de los efectos intracelulares aparentes de los oligómeros son la reducción de las espinas dendríticas maduras, así como el bloqueo del transporte axonal y dendrítico, que además podría preceder a la acumulación extracelular de A β [45]. Adicionalmente, el A β puede ser internalizado por endocitosis en neuronas y células gliales, este mecanismo es favorecido por ApoE al formar un complejo con A β , el cual puede ser reconocido por receptores de ApoE presentes en las neuronas y células gliales. Otros receptores que pueden mediar la internalización de A β son los receptores LRP, el receptor colinérgico nicotínico $\alpha 7$ ($\alpha 7nChR$), el receptor de productos finales de glicosilación avanzada (RAGE) y los receptores NMDAR [46].

Otro aspecto de la toxicidad del péptido amiloide en la EA, sucede a nivel mitocondria. Se ha propuesto que el péptido A β puede ser transportado hacia el interior, a través de los transportadores de membrana mitocondrial TOM40 y TIM23. Dentro de la mitocondria, desencadena un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) e interacciona con los complejos mitocondriales (principalmente complejo IV mitocondrial y ATP sintetasa) de la cadena respiratoria. Esto favorece una disminución en el potencial de membrana y en la producción de energía y la posterior salida del Citocromo c, con lo cual se activa la apoptosis. Se sugiere, que además de importarse el péptido a la mitocondria, la APP forma complejos con los transportadores mencionados e inducir su procesamiento en la membrana mitocondrial, lo que conduciría a una mayor formación del péptido A β , y favorecería el incremento en la disfunción mitocondrial [47].

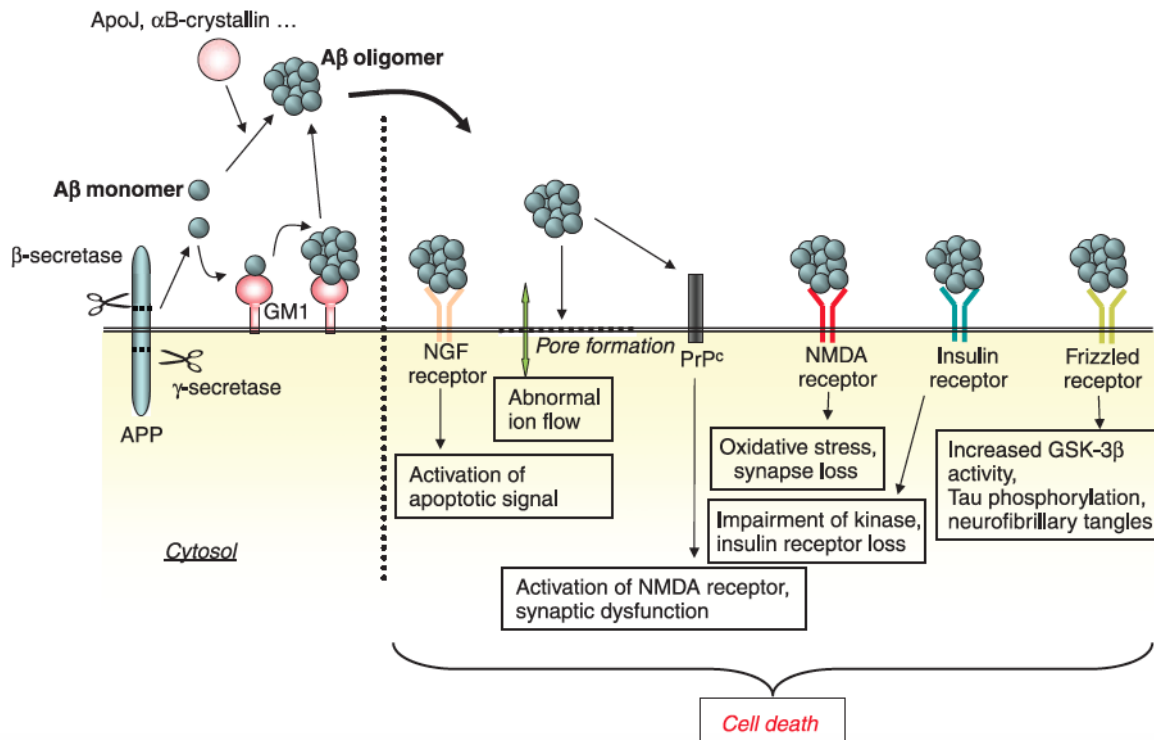


Figura 5. Mecanismos de toxicidad de oligómeros de A β . Se cree que el péptido A β se oligomeriza gracias a interacciones con componentes de la membrana, como el gangliósido GM1. En la figura se muestra que los oligómeros pueden ejercer funciones tóxicas mediadas por la activación de diferentes receptores de membrana o directamente formando poros[24].

Un mecanismo indirecto de neurotoxicidad de A β es la inflamación, la cual pudiera favorecer la neurodegeneración y el deterioro cognitivo observado en la EA [48, 49].

1.3.5 Inflamación mediada por A β

Los agregados de A β contribuyen con el proceso inflamatorio y se ha propuesto que incrementan los niveles de citocinas proinflamatorias como IL-1 β e IL-6, encontrados en el LCR de pacientes con EA [50, 51]. Algunos autores han sugerido que la activación de la microglia, es un evento temprano a la agregación del péptido A β . La microglia es capaz de reconocer a los agregados de A β mediante diversos receptores como los tipo Toll (TLR), tipo NOD, formil péptido, RAGE y receptor del Complemento 3 (CR3) [52-54]. Al llevarse a cabo el reconocimiento, la microglia se activa y produce citocinas proinflamatorias (IL-6, TNF- α , IL-1 β , INF- γ) y anti-inflamatorias (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β), moléculas del complemento (C1q, C3, C4, C9), factores de crecimiento (MCSF); así como un amplio número de quimiocinas responsables del reclutamiento de linfocitos T (CXCL8, CCL5), macrófagos perivasculares (MIP1 α , MIP1 β) y monocitos (MCP-1) [55]. Se cree que, durante las etapas tempranas de agregación del péptido, el ambiente proinflamatorio generado, favorece que la microglia realice una función fagocítica [56]. Sin embargo, esta función es controversial, debido a que existen otros estudios donde se señala que la microglia podría contribuir a la formación de agregados de A β [57].

Los astrocitos también son capaces de reconocer agregados de A β , mediante los receptores RAGE, LPR, proteoglicanos asociados a su membrana y receptores tipo Scavenger [58, 59]. Al activarse los astrocitos, se incrementa la producción de las citocinas proinflamatorias IL-2, INF- γ , IL-1 β , TNF- α , así como la producción de iNOS, óxido nítrico y ROS, que se relacionan con el daño neuronal [60]. Por otro lado, también se sabe que secretan factores neurotróficos con los cuales podrían mediar la supervivencia neuronal [61].

Otra enzima asociada con el proceso inflamatorio, cuya actividad es favorecida por la presencia de agregados de A β , es la ciclooxigenasa 2 (COX-2). El aumento en la actividad COX-2 resulta en una mayor síntesis de prostaglandinas y su incremento, se ha relacionado con la neurodegeneración [62].

En resumen, los agregados del péptido A β promueven la activación de la respuesta inflamatoria (Figura 6) que si se presenta un desbalance en la modulación de esta respuesta, se pierde su efecto benéfico y se exacerbaban los procesos neurodegenerativos [63].

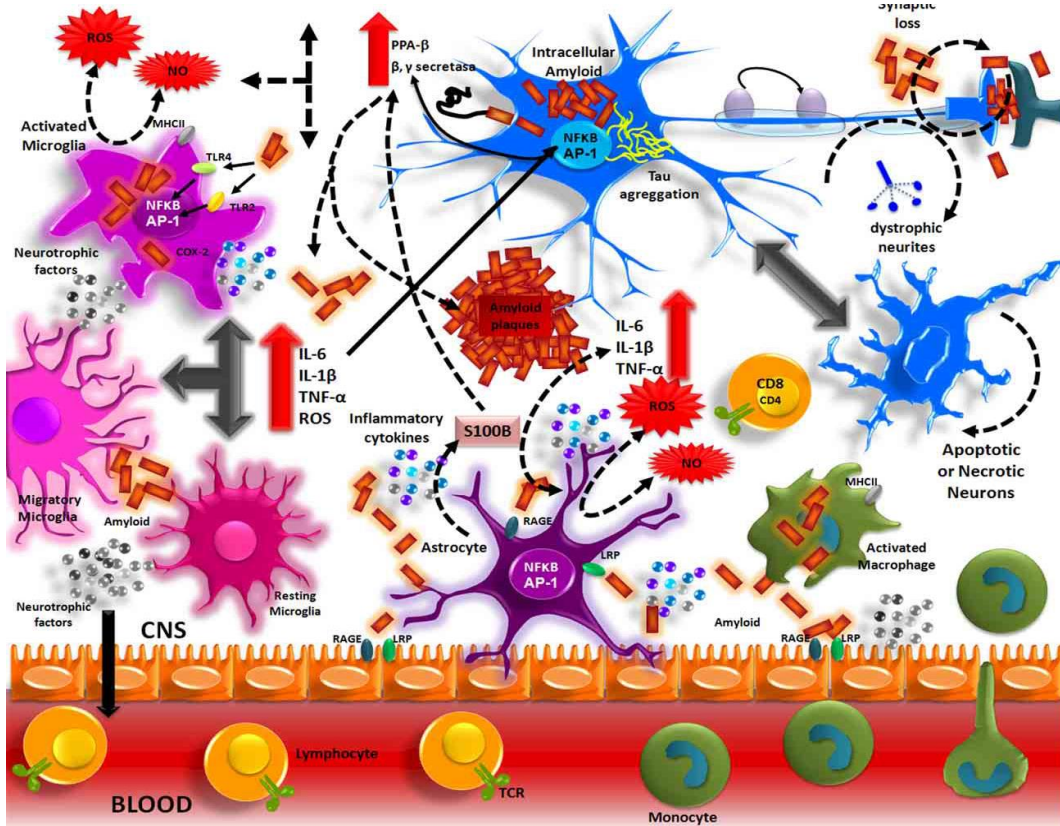


Figura 6. Inflamación mediada por A β . Los diferentes agregados de A β activan a las células de la microglia mediante los receptores RAGE y TLRs. El proceso de activación induce la activación de factores de transcripción como NF- κ B y AP-1, que inducen la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y expresión de citoquinas inflamatorias (IL-1, IL-6, TNF). Las citoquinas actúan directamente sobre las neuronas y estimulan a los astrocitos, que amplifican las señales proinflamatorias, induciendo efectos neurotóxicos. A su vez, los mediadores inflamatorios pueden favorecer la producción de moléculas de adhesión y quimiocinas, para reclutar células inmunes periféricas.

1.3.6 El papel de las citoquinas y su relación con el péptido A β

Las células del sistema inmune son capaces de producir citoquinas, proteínas solubles mediadoras de la inflamación. En el Sistema Nervioso Central (SNC), las citoquinas son producidas por las células de la microglia y los astrocitos, en etapas embrionarias juegan un papel fundamental para el desarrollo del SNC. Las citoquinas participan en los procesos inflamatorios de las Enfermedades Neurodegenerativas. En la EA, se ha descrito que estas proteínas pudieran intervenir en el desarrollo de la patología. Estudios realizados en tejido de pacientes con EA, así como en el LCR han demostrado que existen niveles elevados de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-10, el

TNF- α y el TGF- β [50, 64-66]. El aumento de estas citocinas está fuertemente relacionado con la activación de la microglia ante la exposición de agregados de A β [67]. En un modelo transgénico de ratón que presenta la mutación Sueca en el gen de la APP (K670M y N671L) y en otro modelo de ratón transgénico que presenta la mutación mencionada y una mutación en el gen de la proteína PS1, se ha demostrado una relación directa entre la sobreproducción y agregación del péptido A β derivado de las mutaciones descritas y un incremento en los niveles de los mediadores moleculares TNF- α , IL-6, IL-12, IL-1 β , IL-1 α [68]. A continuación, se describen las citocinas más importantes asociadas con el proceso de inflamación en la EA.

1.3.6.1 Factor de necrosis tumoral α

TNF- α es una citocina que puede tener funciones benéficas o perjudiciales sobre las diferentes neuronas. Esta citocina estimula al factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B), el cual si bien induce la expresión de moléculas pro-inflamatorias, también se ha visto que promueve la síntesis de factores de supervivencia neuronal como la calbindina, la enzima superóxido manganeso dismutasa y la proteína anti-apoptótica Bcl-2[69, 70]. También se ha planteado que esta citocina puede estimular a la glutaminasa de la microglia para liberar glutamato, generando excitotoxicidad[71] y favoreciendo al desarrollo de las Enfermedades Neurodegenerativas. En la EA aún está en duda el papel que juega esta citocina en la patología, sin embargo, se ha propuesto que pudiera estar asociada con un incremento en la expresión de la enzima β -secretasa y γ -secretasa[72, 73]. Modelos in vitro han demostrado que TNF α estimula directamente la expresión del gen de la enzima β -secretasa (BACE1) favoreciendo el procesamiento de PPA β [30]. El uso de inhibidores para TNF α soluble, demostró tener un efecto protector en la desregulación de PPA β al disminuir la formación de agregados de amiloide y atenuar el deterioro cognitivo observado en los ratones 3xTgAD, expuestos a una inflamación periférica crónica [74]. Sin embargo, la supresión a largo plazo de la vía de señalización del receptor de TNF α , puede suprimir la capacidad de la microglia para eliminar de forma eficiente los agregados de A β favoreciendo su agregación en etapas tempranas [75].

1.3.6.2 Ciclooxygenasa 2

Las Ciclooxygenasas son las enzimas responsables de convertir el Ácido Araquidónico en Prostaglandinas (PGs). De manera general, estas moléculas participan en la inflamación debido a que producen vasodilatación, permitiendo el transporte de las células del sistema inmune hacia el

sitio blanco [76]. En el cerebro de mamíferos, se expresan las isoformas COX-1 y COX-2. En condiciones patológicas, la presencia de estas enzimas en el SNC se ha ligado al desarrollo de la inflamación y la neurotoxicidad. La microglia que rodea las PN en tejido de pacientes con EA, muestra una expresión elevada de COX-1 y COX-2, sugiriendo su relación con la inflamación [77, 78]. La sobreexpresión de COX-2 en un modelo triple transgénico (hAPP/PS1/hCOX-2); dio como resultado un aumento en la inmunoreactividad de Caspasa-3 activa y la fosforilación de la proteína de retinoblastoma (S⁷⁹⁵-pRb). La proteína Rb regula la fase G1 del ciclo celular, pero se ha observado que la fosforilación en S⁷²⁵ suprime el crecimiento celular, lo cual podría afectar procesos de proliferación y diferenciación de células no diferenciadas. Estudios in vitro revelaron que la sobreexpresión de hCOX-2 en cultivos primarios de neuronas cortico-hipocampales derivadas de ratones transgénicos, acelera el daño apoptótico inducido por A β , al mismo tiempo que podría causar alteraciones del ciclo celular en células no diferenciadas y se desconoce el efecto que podrían causar las alteraciones en la producción de proteínas del ciclo celular en neuronas post-mitóticas [79]. La COX-2 incrementa la producción de Prostaglandina E2 y favorece la formación de placas de amiloide en el parénquima. El aumento en la formación de placas correlaciona con un aumento en la formación de péptidos amiloideos (A β 40 y A β 42), a través de la activación de γ -secretasa, sin que exista un aumento en los niveles de expresión de PPA β [80]. Estudios realizados en un modelo deficiente de COX-2^{-/-}, demostraron que la respuesta inflamatoria mediada por A β , se ve disminuida sugiriendo que la inhibición de COX-2 podría ser empleada como tratamiento terapéutico [81].

El análisis de tejido cerebral *post mortem* de pacientes con EA, demostró que la inmunoreactividad máxima para COX-2 y pRb, se presenta en los primeros estadios de Braak de la enfermedad, antes de que ocurra la activación máxima de los astrocitos y microglia. Hasta el momento, se desconoce la causa por la cual se generan las alteraciones en los niveles de la enzima COX-2. Sin embargo, se ha sugerido que la inflamación que se presenta en etapas tempranas en la patología de Alzheimer podría promover dichas alteraciones y que IL-1 β , podría promover un incremento de la expresión de COX-2 y producción de PGs [82].

1.3.6.3 Interleucina 1

IL-1 es capaz de inducir la expresión del mRNA de PPA β en las células endoteliales [83]. Por tal motivo, se ha sugerido que el incremento de la IL-1 en pacientes con EA, podría ligarse a la formación del péptido A β . Al mismo tiempo, en un estudio de pacientes con EA se planteó que la

IL-1 era producida por las células de la microglia que rodean las PN y que esta citocina podría promover la síntesis de la proteína S100 β en los astrocitos [84]. Posteriormente, se descubrió que IL-1 era un factor que contribuía para iniciar la formación de neuritas distróficas en los depósitos difusos de beta amiloide [85]. De igual manera la exposición de cultivos primarios de neuronas corticales de rata con la proteína S100 β , favorece la formación de neuritas distróficas y un incremento en el mRNA de PPA β [86]. De esta forma se estableció que IL-1 podría promover la formación de A β y la degeneración neuronal a través de la proteína S100 β , presente en los astrocitos reactivos. También se ha planteado que el aumento de IL-1 en los pacientes con EA podría promover un incremento en la actividad de la cinasa p38-MAPK, que pudiera conllevar a la hiperfosforilación de la proteína Tau [87, 88]. El bloqueo de la señalización de IL-1 β genera una disminución en la actividad de GSK-3 β , disminuye la fosforilación de Tau y la activación de la vía Wnt/ β -catenina, una vía de proliferación y supervivencia celular [89]. Sin embargo, recientemente se ha planteado que IL-1 β podría promover la eliminación del péptido A β [90].

1.3.6.4 Interleucina 6

IL-6 es otra citocina que se produce por células de la microglia y que además la inmunoreactividad presente en tejido de pacientes, se asocia con los niveles clínicos de demencia [91]. Al igual que IL-1, IL-6 promueve la expresión de PPA β [92] y también podría relacionarse con la formación de MNF al inducir la fosforilación de Tau mediante la desregulación de la vía cdk5/p35[93]. Sin embargo, se ha reportado en dos modelos transgénicos para hPPA (TgCRND8 y Tg2576), que la sobreexpresión de IL-6 en el cerebro de estos ratones, generaba una extensa gliosis y una disminución en los depósitos de A β en el cerebro de ratones TgCRND8. Posiblemente como resultado, de una sobre regulación de los marcadores fagocíticos en las células gliales, favoreciendo un aumento en la fagocitosis de A β mediada por la microglia. La neuroinflamación inducida por IL-6 no mostró tener ningún efecto en el procesamiento de PPA β en el ratón TgCRND8, sugiriendo que la gliosis reactiva, pudiera tener un efecto benéfico en estadio tempranos de la enfermedad al promover la eliminación de péptidos A β [94].

1.3.6.5 Interleucina 10

IL-10 es una de las principales citocinas anti-inflamatorias, ejerce su efecto inhibiendo la expresión de citocinas pro-inflamatorias y previniendo la apoptosis [95]. El receptor al IL-10 se encuentra

presente en las células gliales del SNC. La exposición previa de las células gliales a IL-10, produjo una inhibición en la producción de citocinas proinflamatorias inducidas por A β o LPS [96]. Por tal motivo, se esperaba que al inducir un incremento en la expresión de IL-10 se promovería una reducción de la inflamación y la prevención de la apoptosis. Sin embargo, la sobreexpresión de IL-10 en los ratones transgénicos TgCRND8 que sobreexpresan PPA β y desarrollan agregados de A β , indujo la acumulación del péptido y un incremento en el deterioro cognitivo [97]. Al generar un ratón transgénico APP/PS1 knockout para el gen de IL10, se observó que el ambiente inflamatorio es indispensable para que las células de la microglia se activen y fagociten A β [98]. A partir de esos experimentos, se ha planteado que la inhibición farmacológica de esta citocina, resulta una estrategia terapéutica interesante que debe ser más estudiada.

1.3.7 Vías de señalización involucradas en la inflamación mediada por el péptido A β

Como se describió previamente, los agregados del péptido A β son reconocidos por las células gliales a través de diferentes receptores de la inmunidad innata, como respuesta se activarán diferentes vías de señalización intracelular proinflamatorias que favorecen la activación de las células gliales, así como la producción de mediadores moleculares como citocinas, quimiocinas y especies reactivas de oxígeno. Algunas de las vías de señalización activadas son la de c-jun N-terminal cinasa (JNK), la proteína cinasa activada por mitógenos (p38-MAPK) y la vía de las cinasas de los inhibidores kappa B (IKK). Dichas vías favorecen una respuesta proinflamatoria a través de factores de la transcripción como el factor NF- κ B, la proteína activadora 1 (AP-1) y factores reguladores de interferón (IRF) [54]. De estos factores, NF- κ B es considerado el principal regulador de la respuesta inflamatoria, está presente en neuronas y células gliales que rodean a agregados de A β , modula la gliosis y la expresión del gen BACE1, con lo cual podría tener una relación con la producción de A β [99].

Por su parte, los mediadores moleculares de la inflamación secretados por las células gliales activan vías de señalización celular, mediando efectos tanto pro y antiinflamatorios, como neurotóxicos y neuroprotectores.

Un ejemplo claro de citocina proinflamatoria es IL-1 β , que puede favorecer la fosforilación de la proteína tau en neuronas a través de la activación de la vía MAPK-p38 [88]. TNF- α activa la vía

p38-MAPK y JNK por mencionar algunas, y los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B, promoviendo así la inflamación, amiloidogénesis y neurotoxicidad [100]. El interferón gamma, es otro mediador que favorece la expresión del gen BACE1, a través de la vía de las Janus cinasas (JAK), mediante la activación del factor de transcripción STAT1 [101]. A pesar de que pareciera que las citocinas proinflamatorias activan vías cuyos efectos favorecen la neurotoxicidad mediada por los agregados del péptido A β , es necesario considerar el papel importante que juegan en promover la fagocitosis de estos agregados.

La IL-10 es secretada para mantener un balance inflamatorio ante la presencia de agregados. Al conectarse con su receptor, activa la vía de señalización de JAK y los factores transductores y activadores de señales de la transcripción (STATs), uno de ellos es STAT3. Mediante esta vía disminuye la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHCII) y la presentación de antígenos en las células T. En el SNC, se ha descrito que IL-10 podría prevenir la apoptosis mediante la activación de la vía de señalización de la fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato-3-cinasa (PI3K) /Akt. De manera general, IL-10 puede promover la supervivencia de neuronas y una disminución en la activación de células de la microglia. Sin embargo, esto puede tener un impacto negativo en la fagocitosis de los agregados de A β [98].

Otra citocina que activa la vía de señalización JAK/STAT3 es IL-6, un mediador molecular con función pleiotrópica. Como se mencionó previamente, IL-6 puede favorecer la hiperfosforilación de la proteína tau mediante la cinasa cdk5[93]. De la misma forma, se ha propuesto que dicha citocina puede activar la vía JAK/STAT y promover una entrada masiva de calcio a través de los receptores a glutamato NMDA, modificando los patrones de fosforilación de tau[102].

La vía JAK/STAT3 se ha ligado a múltiples funciones en el SNC, una de ellas es favorecer la supervivencia, proliferación y diferenciación celular. Sin embargo, la activación de la vía en los astrocitos favorece su reactividad, con lo cual se puede establecer un perfil proinflamatorio que al presentarse de manera crónica, pudiera contribuir a la muerte de las neuronas y probablemente al desarrollo de patologías, como la Enfermedad de Huntington y la EA[103]. A este respecto se sabe que la presencia de agregados de A β induce la activación de la vía JAK/STAT3, con lo cual se

podrían incrementar la inflamación y neurodegeneración. Por tal motivo, el estudio de esta vía resulta de gran relevancia para proponer estrategias terapéuticas en la EA.

1.3.7.1 La vía JAK/STAT y la neurotoxicidad mediada por A β

La vía de señalización JAK/STAT participa en la modulación de la expresión de genes de funciones como la organogénesis, desarrollo fetal, apoptosis y la inflamación. La vía se expresa en diferentes tejidos y en el SNC, su expresión se ha descrito en diferentes áreas como corteza cerebral, hipotálamo, cerebelo e hipocampo. El papel de la vía JAK/STAT en la proliferación celular es crucial y su alteración se ha ligado al desarrollo de cáncer [103, 104].

Las moléculas responsables de la activación de la vía JAK/STAT (Figura 7) son algunas citocinas, los factores de crecimiento y hormonas. En la vía se involucra a un grupo de cinasas intracelulares JAK (JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2) y siete diferentes factores de transcripción STAT (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B and STAT6). En el caso de la inflamación, cuando una citocina se une a su receptor, dos proteínas JAK son activadas y fosforilan un residuo de tirosina en el receptor de citocinas, proporcionando un sitio de acoplamiento para los dominios conservados SH2 (Src 2 homología) de los factores de transcripción STAT. Posteriormente, las cinasas JAK pueden fosforilar a los factores STAT, mayoritariamente en residuos de tirosina en su extremo C-terminal. La fosforilación de STAT promueve su liberación del receptor, así como formación de homo- y hetero-dímeros, los cuales se translocan al núcleo celular donde modulan la expresión de diferentes genes diana [105].

La vía de señalización JAK/STAT puede ser regulada negativamente por fosfatasas, las cuales controlan el estado de fosforilación y la actividad de JAK y los factores STAT. Las proteínas de la familia de proteínas inhibidoras de la actividad de STAT (PIAS) favorecen su inactivación mediante la sumoilación o impidiendo la unión de los factores STAT al ADN. Por último, un mecanismo importante de retroalimentación negativa en la señalización de las citocinas, a través de la vía JAK/STAT es la producción de proteínas supresoras de señalización de las citocinas (SOCS), cuya producción es estimulada por la actividad de factores STAT. Las proteínas SOCS inhiben la actividad de JAK y compiten con STAT por la unión del receptor [106].

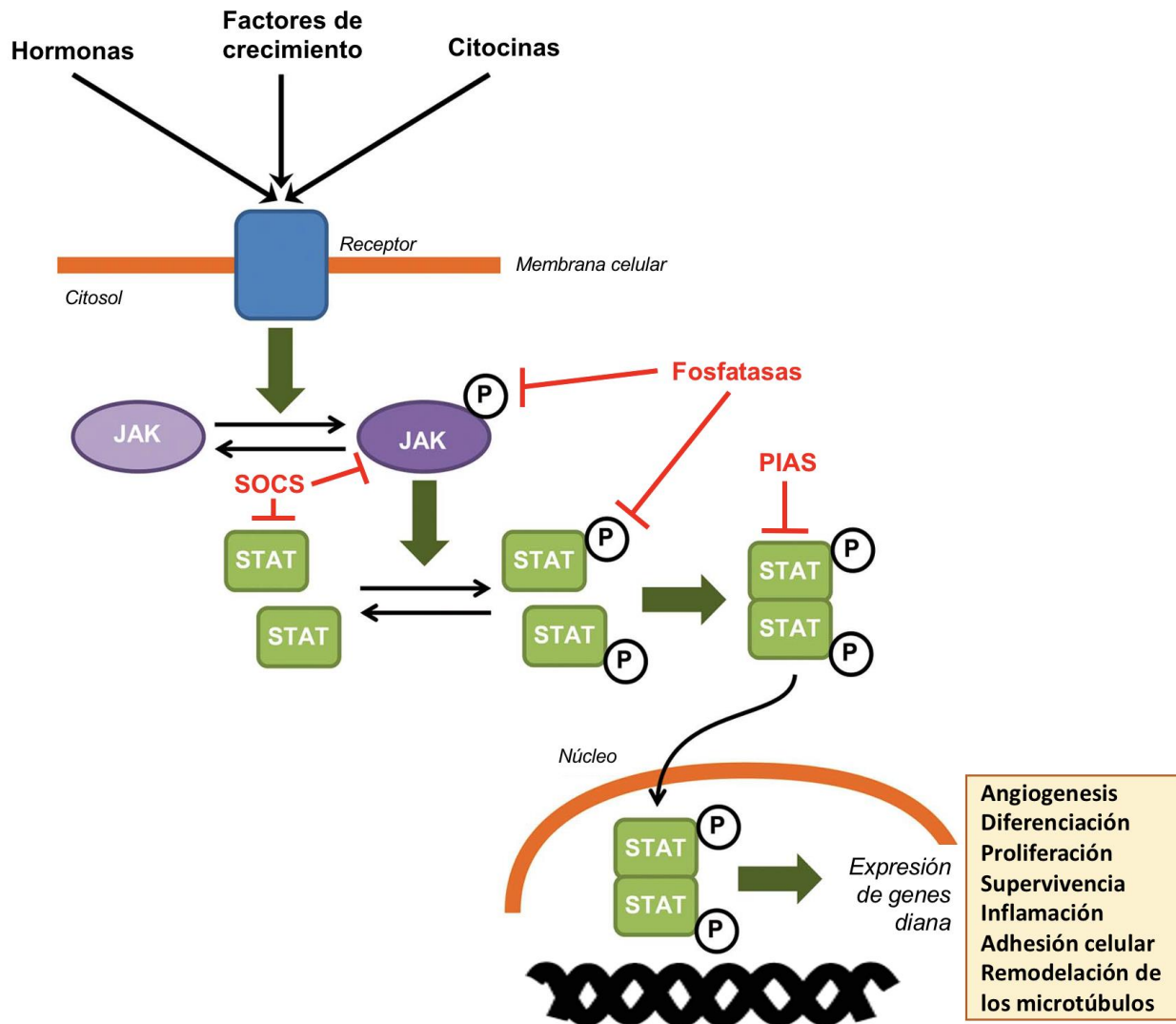


Figura 7. Vía de señalización JAK/STAT. La vía es activada por el reconocimiento de diferentes hormonas, factores de crecimiento y citocinas a sus receptores correspondientes. Las cinasas de la familia JAK se activan por fosforilación y promueven el reclutamiento de los factores de transcripción STAT, los cuales se activan al ser fosforilados por las cinasas JAK y se asocian formando dímeros, que se translocarán al núcleo para modular la transcripción de genes diana asociados a funciones como la angiogénesis, diferenciación, supervivencia celular, adhesión, remodelación de microtúbulos y la inflamación. La modulación negativa de la vía JAK/STAT se lleva a cabo por fosfatasas, proteínas de la familia proteínas supresoras de señalización de las citocinas (SOCS) y de la familia proteínas inhibidoras de la actividad de STAT (PIAS) [104].

En el SNC la vía JAK/STAT juega un papel importante en el mantenimiento de las células madre neurales y progenitoras durante el desarrollo fetal. De la misma forma, se ha reportado que la activación de la vía por el factor neurotrófico ciliar, citocinas como IL-6 y el factor inhibidor de la leucemia, estimulan a los precursores neurales para favorecer la astrogliogénesis durante el desarrollo embrionario, mediante la participación de JAK1, STAT1 Y STAT3 [107].

La plasticidad sináptica es un proceso esencial para el aprendizaje y la memoria espacial en el hipocampo. La depresión a largo plazo mediada por receptores de glutamato tipo NMDA (NMDAR-LTD) es uno de los eventos que favorece la plasticidad. Un estudio realizado en cultivos en rebanada reveló que la NMDAR-LTD, es mediada por la activación de la cinasa JAK2 y el factor de transcripción STAT3, ambos componentes de la vía se encuentran localizados en la post-sinapsis y pueden jugar un papel fisiológico en la transmisión sináptica [108].

Existen evidencias que la vía de señalización JAK/STAT se encuentre relacionada con la apoptosis celular. Un estudio en células de neuroblastoma estimuladas con Interferón, un activador del factor de transcripción STAT1, mostró favorecer la apoptosis mediante la liberación de citocromo c, activación de caspasas y fragmentación del DNA [109]. Sin embargo, otros factores de la vía son claves para promover la supervivencia celular, entre ellos se ha observado que la activación de STAT3 mediante el factor de crecimiento similar a insulina tipo 1, disminuyó la muerte de neuronas corticales previamente expuestas a $TNF\alpha$ [110].

Una de las funciones interesantes de la vía JAK/STAT es la modulación de la inflamación, desempeñando funciones anti- y pro-inflamatorias. El Interferón es una proteína pro-inflamatoria que activa el factor de transcripción STAT1, a través de él, se induce la producción de óxido nítrico, molécula que favorece un ambiente inflamatorio. En modelos de isquemia, se ha observado que la estimulación continua con Interferón y su consecuente activación de STAT1, conduce a la muerte neuronal [111].

Por su parte, el factor de transcripción STAT3 se ha ligado al control en la activación de las células gliales, para la formación de la cicatriz glial ante algún insulto en el SNC. En este sentido, un estudio en ratones condicionados en los que se logró eliminar la expresión de STAT3 en astrocitos, demostró

que la activación del factor de transcripción puede modular de manera positiva la expresión génica de GFAP [112]. Dicho evento, promueve la astrogliosis y, por consiguiente, la secreción de moléculas inflamatorias como IL-6, IL-1 β , IL-4, el factor de crecimiento endotelial vascular y quimiocinas. Algunas de estas moléculas son necesarias para promover la activación y atracción de células de la microglía y del sistema inmune periférico. Este estado inflamatorio es necesario para promover el proceso de regeneración de axones [113].

Aunque la inflamación del SNC es un mecanismo de protección del cerebro ante situaciones que le producen lesión, si este proceso se establece de manera crónica, puede favorecer el desarrollo o la progresión de enfermedades neurodegenerativas. En este sentido, un estudio realizado en roedores donde se administró de manera periférica, diferentes agentes neurotóxicos, se observó que dichos agentes promovían la fosforilación de STAT3 en su tirosina 705 (pSTAT3tyr705), y que este evento precede al incremento en la de expresión de GFAP. Por tal motivo, se sugirió que pSTAT3tyr705 podría representar un bio-marcador de neurotoxicidad [114].

Una de las principales cinasas que fosforila a STAT3 es la cinasa JAK2. En un modelo de isquemia en rata por oclusión de la arteria cerebral media, se observó un incremento en la fosforilación de JAK2 y STAT3, que correlacionaron con un aumento en la expresión de la proteína de alta movilidad 1 (HMGB1). Esta última, favorece la producción de moléculas inflamatorias como TNF α , IL-6 e IL-1 β ; que, en dicho modelo, promueven el daño neuronal post-isquémico [115]. Correlacionando con este estudio, en un modelo de lesión traumática en sustancia blanca en ratas, en donde se desarrolla daño cognitivo, inflamación y muerte de las neuronas del hipocampo y se presenta daño cognitivo, se identificó un incremento en la fosforilación de JAK2 y STAT3 que favorece la apoptosis neuronal [116].

Sin embargo, la función de estas dos moléculas en el SNC no se puede definir como proinflamatoria o patológica. De manera fisiológica, la activación de la vía JAK2 y STAT3 estimula la proliferación celular de las células progenitoras [117]. Otro mecanismo propuesto, es que la activación de STAT3 por citocinas de la familia IL-6, podría disminuir la muerte neuronal ocasionada por la estimulación de los receptores tipo NMDA. La propuesta anterior se basa en el hecho que STAT3 puede inducir un incremento en la expresión de la proteína anti apoptótica Bcl-xL, así como la activación de la vía

de PI3K-Akt que induce la supervivencia celular. Sin embargo, la activación per se de la vía, activará la producción de moléculas de la familia SOCS, las cuales inhiben de manera rápida estos efectos [118]. De estos reportes contrastantes, surge la importancia de determinar las condiciones o exposición a factores neurotóxicos que podrían alterar la vía y condicionarla a que sea estimulada a un rol neuroprotector o neurodegenerativo, así como anti- o pro-inflamatorio. Sin duda un agente neurotóxico que desencadena la activación de la vía JAK/STAT es A β y el estudio de la interacción entre dichas moléculas, ha tomado importancia en la búsqueda de opciones terapéuticas en la EA.

Un estudio realizado en ratones transgénicos que sobreexpresan a PPA β con la mutación sueca, otro en ratones micro-inyectados intracerebroventricular con A β 1-42 y en autopsias de cerebro de paciente con EA, mostraron que la activación de JAK2/STAT3 se encuentra reducida en las neuronas, probablemente como resultado del efecto neurotóxico del propio A β y esto podría estar asociado a la muerte neuronal. La administración nasal del péptido neuroprotector Colivelina, tanto en los ratones transgénicos como en los micro-inyectados con A β , logró incrementar la expresión de STAT3 en las neuronas y disminuir el deterioro cognitivo presentado por los roedores. Colivelina es un péptido derivado de otro péptido neuroprotector, la humanina y se ha sugerido que ambos podrían ejercer su función neuroprotectora de la activación de la vía JAK2/STAT3, la modulación de la apoptosis y regulación de la transmisión colinérgica. De acuerdo a estos resultados, la activación de la vía JAK2/STAT3 favorece la activación de receptores nicotínicos de acetilcolina lo cual pudiera reducir la neurotoxicidad mediada por los agregados del péptido A β [119].

En contraste, se ha reportado un incremento de la fosforilación de STAT3 mediado por la cinasa Tyk2, en corteza e hipocampo de ratones transgénicos APP/PS1, así como en neuronas corticales expuestas al péptido A β y ratones microinyectados con dicho péptido en el hipocampo. La sobreactivación de la vía correlacionó con un incremento de la actividad de caspasa 3 y una disminución de la viabilidad neuronal. Algunos de los mecanismos planteados en los que la sobreactivación de STAT3 podría conducir a la apoptosis, son la producción óxido nítrico mediante la estimulación de la enzima iNOS o la estimulación de la expresión del gen BACE1 [120].

Como hemos visto, la activación de STAT3 forma parte de la regulación de la respuesta inflamatoria en el SNC, por lo que también se ha planteado su relación con el péptido Amiloide. En este aspecto,

se ha descrito que el tratamiento con el péptido A β 25–35, en cultivos primarios de microglia obtenidos de la corteza cerebral de ratas, así como la línea celular BV2, favorece la acetilación y fosforilación de STAT3; conduciendo, a un aumento en la expresión de la proteína 14-3-3 ϵ , frecuentemente asociada con enfermedades neurodegenerativas. En dicho estudio se reconoce que la activación de STAT3 inducida por A β , es resultado de la producción de la IL-6, derivada de la exposición de las células de la microglia a los agregados del péptido [121]. Lo anterior nos sugiere que la inflamación mediada por A β puede ser un mecanismo indirecto con el cual se podría mediar la neurodegeneración.

Estudios recientes exponen la importancia de la vía JAK2/STAT3 en la activación de los astrocitos en presencia de A β . En ratones transgénicos que sobre-expresan APP (APP/PS1dE9), así como en el ratón triple transgénico (3xTg-AD), se presenta un incremento de astrocitos reactivos, positivos a GFAP y Vimentina que rodean los agregados de A β . Un número importante de estas células, expresan el factor STAT3 en estado fosforilado. Cuando en estos ratones se expresa -a través de un sistema lentiviral, al inhibidor natural de la vía, SOCS3, se observa, que la reactividad de los astrocitos disminuye, sugiriendo que la activación de la vía JAK/STAT es importante para mantener el estado activo de dichas células en presencia de los agregados de A β [103]. La estimulación de la cinasa JAK2 en los ratones transgénicos APP/PS1dE9 y 3xTg-AD, mostró una correlación positiva entre el número de astrocitos reactivos positivos a GFAP, con la disfunción sináptica [122]. En los últimos años, con el uso de diferentes estrategias y modelos, se ha propuesto que la reducción de la activación del factor STAT3 en los astrocitos, podría favorecer la eliminación de agregados de A β por las células de la microglia y ser una estrategia terapéutica para frenar el deterioro cognitivo en pacientes con EA [123, 124].

En resumen, los hallazgos reportados en la literatura que señalan la relación, entre los agregados del péptido A β con la vía de señalización JAK/STAT3, son contrastantes. Profundizar en el estudio de la activación de STAT3 en presencia de formas oligoméricas del péptido, debiera ser ampliamente explorado para esclarecer la posible regulación temporal y espacial de dicho factor de transcripción. Sin embargo, es importante señalar que no se debe de excluir su participación en las funciones neuro-protectoras y las neurotóxicas, que pudieran favorecer los diferentes escenarios relacionados a la agregación de A β en la EA.

2. JUSTIFICACIÓN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la demencia más común en adultos mayores, su prevalencia a nivel mundial se ha incrementado de una manera alarmante, debido entre otras cosas al incremento de los índices de longevidad, disminución de la fecundidad y estilos de vida demandantes. Durante años, en México, se ha subestimado la prevalencia e incidencia de las enfermedades crónico-degenerativas que afectan al adulto mayor y no se cuenta con los recursos ni la infraestructura para garantizar su atención. Uno de los problemas más complicados de esta patología, que cursa con un deterioro cognitivo progresivo, es el hecho de que el diagnóstico definitivo de EA se realiza de manera post-mortem. En la literatura, existen diversos estudios enfocados a identificar moléculas candidatas con actividad moduladora.

A través del análisis de la hipótesis de agregación de la proteína tau y del péptido A β , se ha descubierto que la inflamación tiene un papel protagónico en promover la degeneración a lo largo del desarrollo y la evolución de la EA. Por tal motivo, en el laboratorio consideramos importante la identificación de mediadores de la inflamación, los cuales son producidos principalmente por las células gliales y se ha puntualizado que los oligómeros de A β tienen un efecto estimulador mayor sobre ellas, a diferencia de otros agregados del mismo péptido.

La activación de las células gliales por el A β , favorece de manera aguda la fagocitosis de agregados de A β , promoviéndose así la supervivencia neuronal. Sin embargo, la sobreproducción de mediadores moleculares de la inflamación, podrían conllevar a alteraciones en vías de señalización que promuevan procesos de neurotoxicidad y neurodegeneración, tal es el caso de la vía JAK2/STAT3. En condiciones fisiológicas, esta vía participa en procesos de plasticidad y supervivencia neuronal, sin embargo, se sabe que el A β , es capaz de inducir la activación de STAT3 favoreciendo el daño neuronal. De la misma manera, la activación de STAT3 en astrocitos, es capaz de alterar la eliminación de amiloide conduciendo al daño sináptico. Por tal motivo, planteamos desarrollar un modelo de microinyección de oligómeros de A β , en la región de CA1 del hipocampo de rata, para identificar posibles mediadores de la inflamación, en específico, algunas citocinas que pudieran estar modulando la respuesta inflamatoria y favoreciendo los efectos neurotóxicos de los oligómeros de A β .

3. OBJETIVOS

3.1 GENERAL

- ❖ Demostrar mediante un modelo de microinyección en la región de CA1 del hipocampo de la rata, que los oligómeros de A β , promueven la activación glial y producción exacerbada de mediadores moleculares de la inflamación, los cuales favorece la neurodegeneración a través de la vía JAK2/STAT3.

3.2 PARTICULARES

- ❖ Realizar un estudio temporal de la neurodegeneración y activación glial tras la microinyección de oligómeros de A β en la región de CA1 del hipocampo de la rata.
- ❖ Describir alteraciones en la producción de mediadores moleculares de la inflamación (*IL-1 β* , *IL6*, *IL-10*), en el modelo de microinyección de oligómeros de A β .
- ❖ Describir la participación de la Vía JAK2/STAT3 en la inflamación mediada por oligómeros de A β , en el modelo de microinyección de oligómeros de A β .
- ❖ Determinar el papel de la Vía JAK2/STAT3 en la neurodegeneración mediada por A β O, en cultivo primario de hipocampo de rata.

4. HIPÓTESIS

Los oligómeros de A β promueven la producción de mediadores de la inflamación y estimulan la vía de señalización JAK2/STAT3 en las células gliales, favoreciendo la neurodegeneración.

5. MÉTODOS

5.1 Preparación e identificación de oligómeros del péptido A β .

Para la preparación del péptido, se realizó una dilución del péptido sintético A β 1-42 de origen humano (AnaSpec AS-20276) en 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP, Sigma H-8508) para obtener una concentración final de 1 mM.

El péptido se incubó a temperatura ambiente durante 1 h y el vial se enfrió a 4°C durante 15 minutos. Posteriormente, se dejó evaporar el HFIP toda la noche a temperatura ambiente en la campana y los tubos se transfirieron a un speed vac para eliminar los restos de HFIP. El pellet se resuspendió en Dimetil sulfóxido (DMSO Sigma) puro para hacer una solución de 5 mM del péptido y finalmente, se llevó a una concentración de 100 μ M con solución amortiguadora de fosfatos 1X (PBS 1X). Para obtener formas oligoméricas del péptido, se incubaron las alícuotas de 100 μ M a 4 °C durante 24 h [125].

La formación de oligómeros se comprobó mediante la técnica de Microscopia Electrónica de Transmisión. Para tal efecto, se utilizaron 5 μ l de la muestra de oligómeros y se colocaron en una rejilla de cobre de 200 mesh tratadas con fomvar (Electron Microscopy FCF-200-Cu) y se dejaron secar durante una noche. Posteriormente, fueron revisadas sin contraste en un Microscopio Electrónico de Transmisión marca FEI modelo TECNAI Biotwin a 80 KV.

5.2 Modelo Animal.

Se utilizaron ratas Wistar macho de 12-14 semanas de edad, con un peso aproximado de 230-250 g que fueron adquiridas del bioterio Bioinvert® (SENASICA AUT-B-A-1016-028). Las ratas se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura de 20-24 °C, el porcentaje de humedad relativa de 50-60%, ciclos de luz-oscuridad de 12/12 h, agua y alimento a libre demanda, siguiendo las normas de producción y cuidado animal NOM-062-ZOO-1999.

Previo a la cirugía, las ratas fueron anestesiadas vía intramuscular con Ketamina (85 mg/kg)-Xilazina (12 mg/kg) y colocadas en un aparato estereotáxico Stoelting en donde se realizó la asepsia adecuada sobre la piel que recubre al cráneo. Posteriormente se realizó una incisión con bisturí y se procedió a limpiar el periostio. Mediante un micro-manipulador, se colocó una aguja dental calibre 30 G montada en las siguientes coordenadas: -0.30 mm dorsal/ventral, \pm 0.25 mm lateral y -0.42

mm antero/posterior respecto al bregma, que corresponden a la región del CA1 del hipocampo según el Atlas de Paxinos [126]

El sistema de microinyección consta de la aguja dental 30G, la cual se encontraba conectada mediante una manguera de poliuretano a una jeringa Hamilton de 10 μ l, colocada sobre una bomba de infusión (Kd Scientific KDS-100). Con la finalidad de realizar una microinyección controlada se fijó una velocidad en la bomba de infusión de 12 μ l/h durante 5 minutos y la aguja fue retirada 5 min después de terminar la inyección.

En este proyecto se utilizó un grupo experimental de ratas, a las cuales se les realizó una microinyección bilateral de 1 μ l de oligómeros de A β 1-42 (grupo experimental), preparados como previamente se describió. Asimismo, se diseñó un grupo control de daño mecánico, para el cual se utilizaron ratas que fueron microinyectadas de manera bilateral con 1 μ l de solución salina fisiológica (NaCl 0.9%) estéril (grupo control o SS). Para evaluar los efectos agudos y crónicos de los oligómeros, los animales (grupo experimental y grupo control) fueron sacrificados en los siguientes tiempos post-inyección: 18h, 72h y 7 días, para los tiempos agudos y 15 días y 30 días para el efecto crónico.

5.3 Sacrificio de animales

Considerando las técnicas a realizar, se llevaron a cabo dos tipos de sacrificios. Para la obtención de tejido fresco, las ratas fueron decapitadas mediante guillotina con previa administración de anestésico, cumpliendo con la norma NOM-033-SAG/ZOO-2014 y se realizó la disección del hipocampo y de la corteza cerebral, preservando posteriormente los tejidos en congelación a -80 °C.

Para las técnicas de tinción de tejido, se realizó una perfusión intracardiaca con una solución salina fisiológica estéril, seguida de una solución de Paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7.2) y al finalizar, se obtuvo el cerebro y se almacenó en una solución de Paraformaldehído al 4% -Sacarosa al 4% en Buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7.2) por 1 semana.

5.4 Análisis ultraestructural por Microscopía Electrónica de Transmisión.

El proceso de perfusión y fijación del tejido cerebral se realizó mediante una solución compuesta de 4% de Paraformaldehído y Glutaraldehído al 2.5 % (Karnovsky) en PBS 1X (pH 7.4). Se realizaron disecciones de las regiones de CA1 y GD del hipocampo de las ratas y los tejidos fueron procesados en un equipo LEICA EM TP, cuyo procedimiento incluye lavados en Buffer de Cacodilatos 0.15M pH 7.2, post-fijación en Tetraóxido de Osmio al 1%, 1.30 h de deshidratación de alcoholes graduados (30-100%), infiltración con resina EMBET 812 (Electron Microscopy Science) en las siguientes proporciones 2:1 (2hrs), 1:1 (2hrs), pura 2x (4hrs).

Posteriormente, se realizaron cortes finos de 90 nm, los cuales se montaron en rejillas de cobre de 200 mesh y se contrastó con Acetato de Uranilo al 2% en solución acuosa y Citrato de Plomo de Reynold's. Los tejidos se observaron a diferentes aumentos y las imágenes fueron capturadas en un Microscopio Electrónico de Transmisión marca FEI modelo TECNAI Biotwin a 80 KV.

5.5 Inmunohistoquímica.

Los cerebros almacenados en Paraformaldehído al 4%-Sacarosa al 4% se dividieron de manera sagital y cada hemisferio se procesó por separado. Inicialmente, se realizó la deshidratación del tejido en alcoholes graduales (70, 96 y 100%), seguida de la aclaración mediante xilol e inclusión en parafina. Se obtuvieron cortes seriados de 8 μ M de grosor en el micrótomo Thermo Fisher HM 325 y fueron montadas en laminillas cargadas (Biocare Medical). Las laminillas con tejido se desparafinaron e hidrataron con xilol, etanol-xilol y alcoholes graduales (100, 96 y 70%). Posteriormente, se llevó a cabo la recuperación antigénica con Buffer de Citratos 0.1 M, pH 6 y 0.2% Tritón en baño maría por 12 min. A continuación, se dejaron enfriar las laminillas y se rodearon los tejidos con marcador hidrofóbico.

Para la inmunohistoquímica (IHC), se bloquea la peroxidasa endógena con bloqueador dual de la enzima endógena (Dako S2003) por 10 min. Las uniones específicas fueron bloqueadas con Background Sniper (Biocare Medical BS966) por 15 min. El tejido se incubó con anticuerpo primario a 4 °C toda la noche. El reconocimiento del anticuerpo se realizó con el detector Mach2 Universal HRP-Polymer Detection (Biocare Medical M2U522) por 30 min sobre el tejido y se utilizó Diaminobencidina (DAB, Dako K3468) como cromógeno para el revelado de la tinción. Para

montar la laminilla, se deshidrataron por alcoholes graduales (70-100%), seguidos de Xilol. Finalmente, se montaron los tejidos con resina EcoMount (Biocare Medical EM897L). Las imágenes se capturaron en un microscopio Leica DM-LS (Leica Microsystems, Wetzlar, GmbH, Germany). Los anticuerpos primarios utilizados en la inmunohistoquímica fueron ratón anti-NeuN 1:200 (Millipore MAB377) y conejo anti-STAT3 (1:100 Novus, NBP2-67432).

5.6 Inmunofluorescencia.

Después de realizar la recuperación antigénica mencionada en el punto anterior, se permeabilizó la membrana con BSA 2%-Tritón 0.02% durante 15 min. Las uniones inespecíficas fueron bloqueadas con BSA al 2% durante 10 min. A continuación, se incubó durante toda la noche con los anticuerpos primarios a 4°C. Los anticuerpos utilizados en este proyecto fueron los siguientes ratón anti-NeuN 1:200, pollo anti-GFAP 1:1000 (Abcam ab4674), conejo anti-Iba1 1:300 (Genetex GTX100042), conejo anti-STAT3 1:100 (Novus, NBP2-67432) y ratón anti-MAP2 1:300 (Millipore, MAB3418).

Posterior a la incubación, se realizaron 5 lavados con PBS 1X y se continuó con la incubación de anticuerpo secundario durante 1 hr a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios empleados, fueron los siguientes: Cabra Anti-pollo IgY Alexa Fluor 488 1:300 (Abcam ab150173), cabra Anti-ratón IgG (H+L) Cy5 1:150 (Zymed 816516), y cabra Anti-conejo IgG Alexa 555 1:300 (Cell Signaling 4413S). La preservación de fluoróforos y montaje de laminillas se llevó a cabo con VectaShield (Vector Laboratories H-1000). Las imágenes se capturaron en un microscopio CONFOCAL Leica TCS SP8 y fueron procesadas en el software LAS AF (Leica Microsystems), empleando el objetivo de 40x.

5.7 Tinción con Fluorojade B.

Para evaluar el proceso de neurodegeneración, mediante la técnica de Fluorojade B (FJB), se realizaron cortes seriados de 8 µm de los tejidos. Las laminillas, se desparafinaron e hidrataron en alcoholes graduales de (100, 96 y 70%). Posteriormente, fueron tratadas por 5 minutos en una solución de 80% EtOH-5% NaOH, 2 minutos en Alcohol al 70% y 2 minutos en agua destilada. Las laminillas fueron sumergidas en una solución de K₂MnO₄ al 0.06% por 20 minutos, se enjuagaron

con agua destilada y se dejaron incubando toda la noche a 4°C con una solución Fluoro-jade B (Millipore AG310) al 0.001% en ácido acético 0.1%.

Por último, las laminillas se dejaron secar toda la noche a temperatura ambiente protegidas de la luz y se pasaron por Xilol para posteriormente ser montadas con resina EcoMount. Las imágenes se capturaron en un microscopio de epifluorescencia Leica DM-LS a 40x (Leica Microsystems, Wetzlar, GmbH, Germany).

5.8 Conteo de neuronas maduras y degeneradas.

Las neuronas maduras fueron identificadas a través del marcaje mediante inmunohistoquímica con el anticuerpo Anti-Neun, para lo cual se seleccionaron 4 ratas de los grupos control y A β , correspondientes a los tiempos de 15 y 30 días. Para realizar la estimación de neuronas degeneradas, se utilizó la tinción de Fluoro-Jade B a 4 ratas de los grupos control y A β , correspondientes a los tiempos de 18h, 72h y 7 días.

En ambos casos, se obtuvieron cortes seriados sagitales a partir de la región de la lesión desde 2.5 a 2.668 mm lateral. A partir de la primera coordenada se evaluaron 3 cortes con una separación de 80 μ m entre cada uno. En cada uno de los cortes, se realizaron 3 conteos en campos contiguos en la región de CA1 y otra cantidad similar en la región de CA1. Las imágenes de cada una de las tinciones mencionadas, fueron capturadas con el uso del software LAS AF del microscopio de epifluorescencia Leica DM-LS a 40x (Leica Microsystems, Wetzlar, GmbH, Germany) y el área de conteo utilizada fue de 0.265 x 0.365 mm. Para las comparaciones entre los tratamientos, se reportó el promedio del número de células por mm² de cada rata evaluada.

5.9 Cuantificación de citocinas por ensayo Multiplex.

Tejidos de hipocampo y corteza se homogenizaron en una solución de PBS 1X-Tritón 0.01% con Cóctel inhibidor de proteasas (Sigma P8340), utilizando el kit de homogenización de Sample Grinding (Amersham Biosciences 80-6483-37) y el homogenizador FatGene Tissue Grinder (Nippon Genetics NG010). Los homogenados se centrifugaron a 1000 g por 10 min a 4 °C y el sobrenadante recuperado se centrifugó a 20,000 g por 40 min a 4°C, para remover los restos celulares.

Se realizó una cuantificación de proteínas por el método de Ácido Bicinconinico (BCA, Sigma B9643) previa a la cuantificación de proteínas.

La determinación de citocinas se realizó de acuerdo al método indicado en el kit Milliplex basado en el uso de anticuerpos acoplados a perlas magnéticas MAP Rat cytokine/chemokine magnetic bead panel kit (Millipore RECYTMAG-65K-03). Las lecturas se realizaron en un equipo LUMINEX MAGPIX y los resultados fueron analizados con el software xPONENT y MILLIPLEX Analyst versión 5.1 (Millipore). Los rangos de sensibilidad de las citocinas detectadas fueron IL-1 β 2.4-10000 pg/mL, IL-6 73.2-300000 pg/mL e IL-10 7.3-30000 pg/mL.

5.10 Evaluación de la expresión génica por RT- qPCR.

El RNA total se extrajo de hipocampo y corteza de ratas, de acuerdo con el método descrito en la hoja de documentación del reactivo TRIzol® (Invitrogen 15596026). La cuantificación de RNA se realizó mediante el espectrofotómetro (ACTGene ASP3700) a 260 nm, la pureza se verificó mediante la relación 260nm/280 nm y la integridad del RNA mediante el corrimiento electroforético de las muestras en gel de agarosa al 1.5%. y visualizada en un fotodocumentador MiniBis Pro (DNR Bio Imaging Systems).

La obtención de cDNA se realizó mediante la reacción con retrotranscriptasa inversa (RT) a partir de 500 ng de RNA total, utilizando el kit AMPIGENE® cDNA Synthesis (Enzo Life Sciences ENZ-KIT106). El cDNA obtenido, fue alicuotado diluído 1:5 y almacenado a -80°.

La reacción cuantitativa de la polimerasa en cadena (qPCR) se llevó a cabo mediante sondas de expresión génica TaqMan (Applied Biosystems) en un termociclador 7500 Fast Real Time PCR, de acuerdo con las condiciones estándares del proveedor (Applied Biosystems).

Los ensayos específicos de genes analizados fueron β -actina (Cat. Núm. Rn00667869_m1) e IL-6 (Cat. Núm. Rn01410330_m1). El análisis se llevó a cabo considerando el cambio en la expresión relativa de los niveles de transcripto mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando como gen de referencia a β -actina.

5.11 Modelo celular de inhibición de JAK2/STAT3

Se obtuvo un cultivo primario mixto de hipocampo de ratas Wistar postnatales de 2-4 días, tomando en cuenta el método reportado por Osorio y colaboradores [127]. El cultivo se mantuvo por 15 días para dar inicio al ensayo de inhibición de JAK2/STAT3. La inhibición de la actividad de la tirosina cinasa JAK2, se llevó a cabo mediante el uso de AG490 (Calbiochem, San Diego, CA, USA), una molécula que inhibe la fosforilación de la cinasa y junto con ello su actividad [128]. La inhibición del factor de transcripción STAT3 se realizó mediante el uso de la molécula pequeña Stattic (Santa Cruz Biotechnology, Sc-202818), la cual inhibe la fosforilación de los residuos de tirosina cinasa de los dominios SH2 en la molécula, evitando que el factor STAT3 forme dímeros y transloque al núcleo para activar sus genes diana [129].

Se realizaron 2 ensayos para cada inhibidor, en donde se plantearon los siguientes tratamientos utilizando cultivos independientes: vehículo (DMSO), Inhibidor, A β O y A β O + Inhibidor. En la Figura 7, se muestra un esquema de los respectivos ensayos de inhibición.

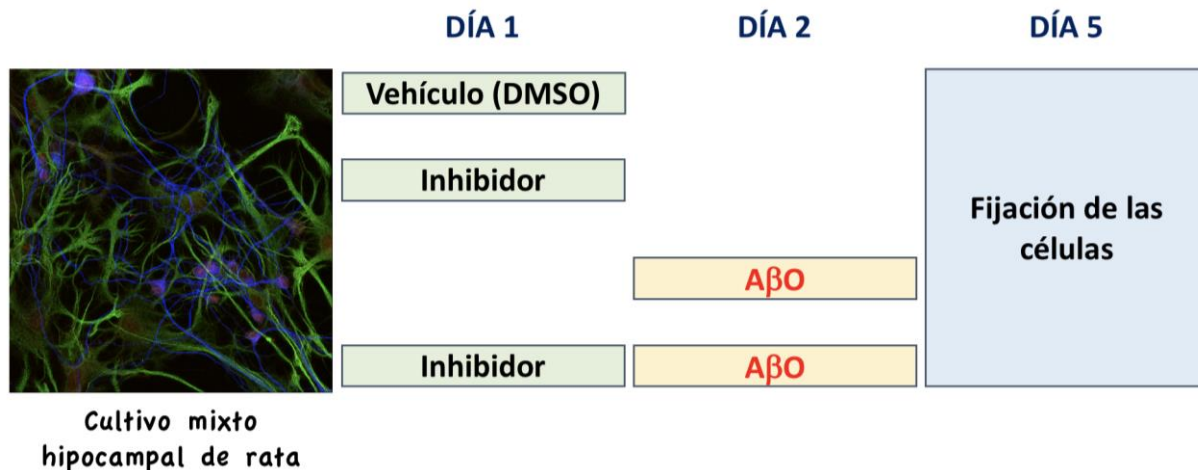


Figura 8. Ensayo de inhibición de JAK2/STAT3 en cultivo celular. En el día 1 del ensayo, se añadieron a cultivos independientes los tratamientos Vehículo (DMSO) e Inhibidor en diferentes concentraciones por duplicado. En el caso del inhibidor Stattic se probaron en concentraciones de 5, 10 y 15 μ M, mientras que para el AG490 se utilizó en concentraciones de 25 y 50 μ M. En este día se llevó a cabo la oligomerización del A β , partiendo de una concentración inicial de péptido de 20 μ M. En el día 2 del ensayo, se añadieron los oligómeros de A β a cultivos sin tratamiento experimental previo y a un cultivo de cada concentración de los inhibidores mencionados. El ensayo se concluyó en el día 5, retirando el medio de cultivo y realizando la fijación de células.

Al término del ensayo de inhibición, se realizó la fijación de células con Paraformaldehído al 4% y se realizó la técnica de inmunotinción utilizando los siguientes anticuerpos primarios: ratón monoclonal anti-MAP2 (1:300, Millipore, MAB3418), ratón monoclonal anti-NeuN, conejo policlonal anti-STAT3 (1:100 Novus, NBP2-67432), pollo policlonal anti-GFAP. La detección de dichos anticuerpos se llevó a cabo por fluorescencia, utilizando los anticuerpos secundarios: cabra anti-pollo IgY Alexa Fluor 488, cabra Anti-ratón IgG Cy5, cabra anti-conejo IgG Alexa 555 (1:300, Abcam, ab150086). Las imágenes fueron capturadas mediante microscopía confocal (Leica Microsystems) y se obtuvieron los valores densidad integrada de la fluorescencia del marcaje del anticuerpo anti-STAT3 total, dichos valores fueron calculados mediante el software Fiji [130]. La densidad integrada es un parámetro donde se cuantifican los píxeles muy brillantes y tenues, derivados de la señal de fluorescencia de la marca analizada en la región de interés seleccionada.

5.12 Análisis estadístico

El análisis de los resultados derivados del modelo animal y celular se realizó en el software estadístico MiniTab® v. 19, utilizando un nivel de significancia de (α) 0.05. Como primer proceso, se llevó a cabo un análisis de igualdad de varianzas con la prueba de Levene. Posteriormente, mediante una prueba ANOVA de una vía por comparaciones específicas, se analizaron los resultados de los 5 tiempos evaluados (18 h, 72 h, 7d, 15d y 30d) para el grupo control (SS) y de manera independiente, se replicó el análisis para el grupo experimental (A β). Finalmente, determinamos las posibles diferencias significativas entre los resultados obtenidos para los grupo experimental y control en cada tiempo de sacrificio analizado, mediante la prueba t-Student.

6. RESULTADOS

6.1 Identificación de oligómeros del péptido A β .

La muestra de oligómeros se preparó incubando a 4°C por 24 h, una solución 100 μ M de péptido A β 1-42 en estado monomérico, mediante el método previamente descrito. El análisis de esta preparación se realizó en microscopía electrónica de transmisión, para corroborar la presencia de formas oligoméricas. En la Figura 9A, se observa una magnificación de la muestra, en la cual se denota la presencia de formas globulares, así como la ausencia de protofibrillas y formas fibrilares del péptido. En la Figura 9B, se muestra un acercamiento, donde se corrobora la presencia de formas globulares y esféricas, que de acuerdo con la bibliografía [131, 132], corresponden a formas oligoméricas del péptido A β 1-42.

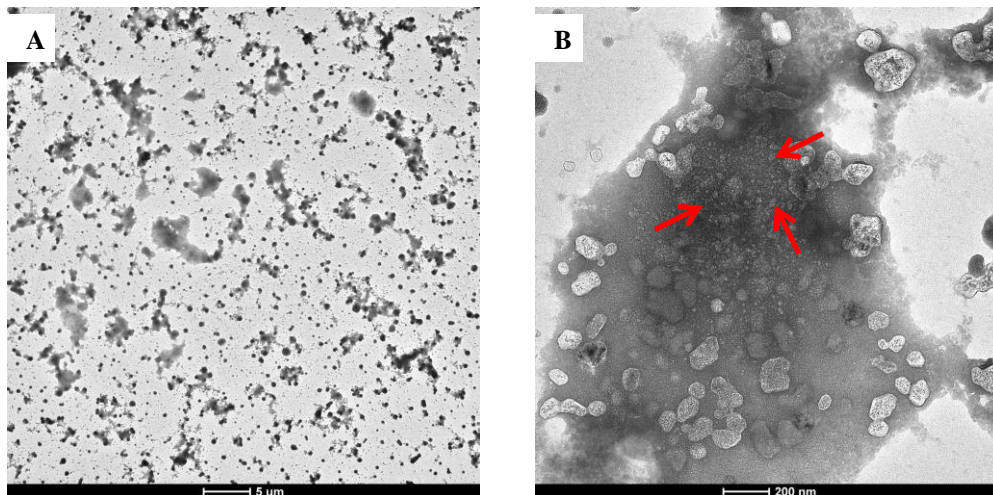


Figura 9. Identificación de oligómeros por microscopía electrónica de transmisión. A) Micrografía de oligómeros preparados a partir de péptido A β 1-42 en estado monomérico. B) Acercamiento de la muestra en donde se señalan con flechas rojas, una sección en la cual se encuentran presentes pequeñas formas esféricas y globulares, que corresponden a los oligómeros de A β 1-42.

6.2 Degeneración neuronal mediada por A β O.

La degeneración neuronal se evaluó en grupos de ratas que fueron sacrificadas a las 18h, 72h y 7 días con la tinción de FJB (Figura 10). En la región CA1, los oligómeros A β promovieron un aumento significativo ($p < 0.05$) de las células positivas para FJB en comparación al grupo tratado con solución salina a las 18 h. Estas células disminuyeron en ambos grupos de ratas sacrificadas a las 72 h; pese a esto, se mantuvieron moderadamente incrementadas ($p < 0.01$) en las ratas

microinyectadas con A β . Si bien la gráfica de cuantificación de la región CA1 muestra un aumento aparente de células positivas a FJB en el grupo con A β en el día 7, la diferencia no fue significativa. En contraste con estos resultados, las células positivas para FJB sólo se detectaron en la región del giro dentado (GD) en el grupo de ratas microinyectadas con oligómeros A β ; las cuales fueron sacrificadas a las 72h posteriores a la cirugía estereotáxica y permanecieron sin cambios al día 7. Aunque en el gráfico de cuantificación existe una disminución aparente de células positivas a FJB en este día, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los 2 tiempos evaluados de ambos grupos de ratas.

El número de células positivas a FJB disminuyó a los 15 y 30 días posteriores a la microinyección. Con el objetivo de obtener una representación indirecta del proceso neurodegenerativo a estos tiempos, se realizó la cuantificación de neuronas positivas para NeuN en el hipocampo (15 y 30 días) (Figura 11). Como se observa en la gráfica, hubo una reducción en el número de células positivas para NeuN en la región CA1 del hipocampo, con el tratamiento de A β O en comparación con su grupo control de solución salina ($p < 0.01$ y $p < 0.05$ respectivamente), en ambos tiempos. Por otro lado, con las imágenes de IHC fue posible evidenciar espacios vacíos derivados de la pérdida de neuronal, al igual que la presencia de algunas neuritas distróficas, así como el desorden de células piramidales; todo esto promovido principalmente por los oligómeros A β . A su vez encontramos una disminución modesta de las células positivas para NeuN entre los grupos control de 15 y 30 días ($p < 0.05$) probablemente inducida por la lesión mecánica inicial. Sin embargo, los oligómeros A β generaron una mayor pérdida neuronal mantenida a través del tiempo.

La mayoría de los espacios de pérdida neuronal se detectaron principalmente en la región del GD de ratas tratadas con oligómeros de A β y sacrificadas al día 15. Esto correlaciona con la disminución significativa de células positivas para NeuN en el grupo de A β ($p < 0.01$), tal y como se observa en la gráfica de cuantificación respectiva. Sin embargo, como puede observarse en la figura 11, a los 30 días posteriores a la cirugía los espacios de pérdida neuronal se redujeron lo, cual correlaciona con un aumento en el número de células positivas para NeuN ($p < 0.05$). Esto posiblemente relacionado con un fenómeno de recuperación en la región del GD, un nicho de neurogénesis.

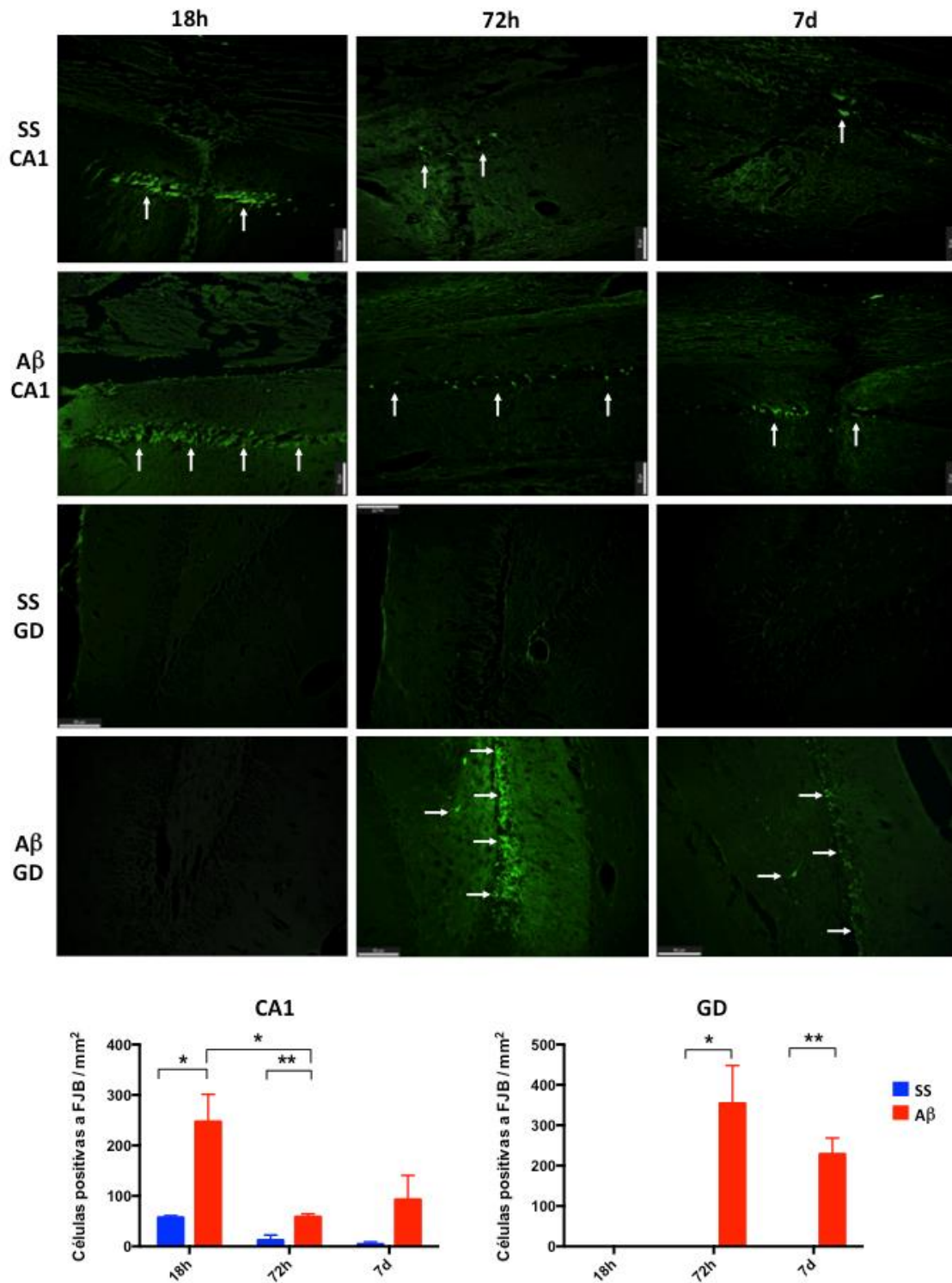


Figura 10. Cuantificación de neuronas degeneradas. La tinción de Fluoroyade B (FJB) se utilizó para identificar las neuronas en degeneración, en las regiones CA1 y GD. Parte superior: Se muestran imágenes representativas (20x) de ratas SS y Aβ, sacrificadas después de 18h, 72h y 7 días (barra de escala = 50 μm, las flechas blancas marcan las células positivas a FJB). AβO promueven una mayor muerte celular en ambas regiones a diferencia de la SS. Parte inferior: El análisis cuantitativo (n = 3) en CA1 muestra una mayor tinción de FJB en ratas con Aβ a las 18 h, la cual disminuye a las 72 h. Mientras tanto en el GD, las células positivas para FJB sólo se detectaron en las ratas administradas con AβO y sacrificadas después de 72 h. En las gráficas, se muestra el promedio de células positivas a FJB/mm², con barras de Error Estándar de la Media (SEM). Los niveles de significancia se encuentran marcados como * p < 0.05, ** p < 0.01 y *** p < 0.001.

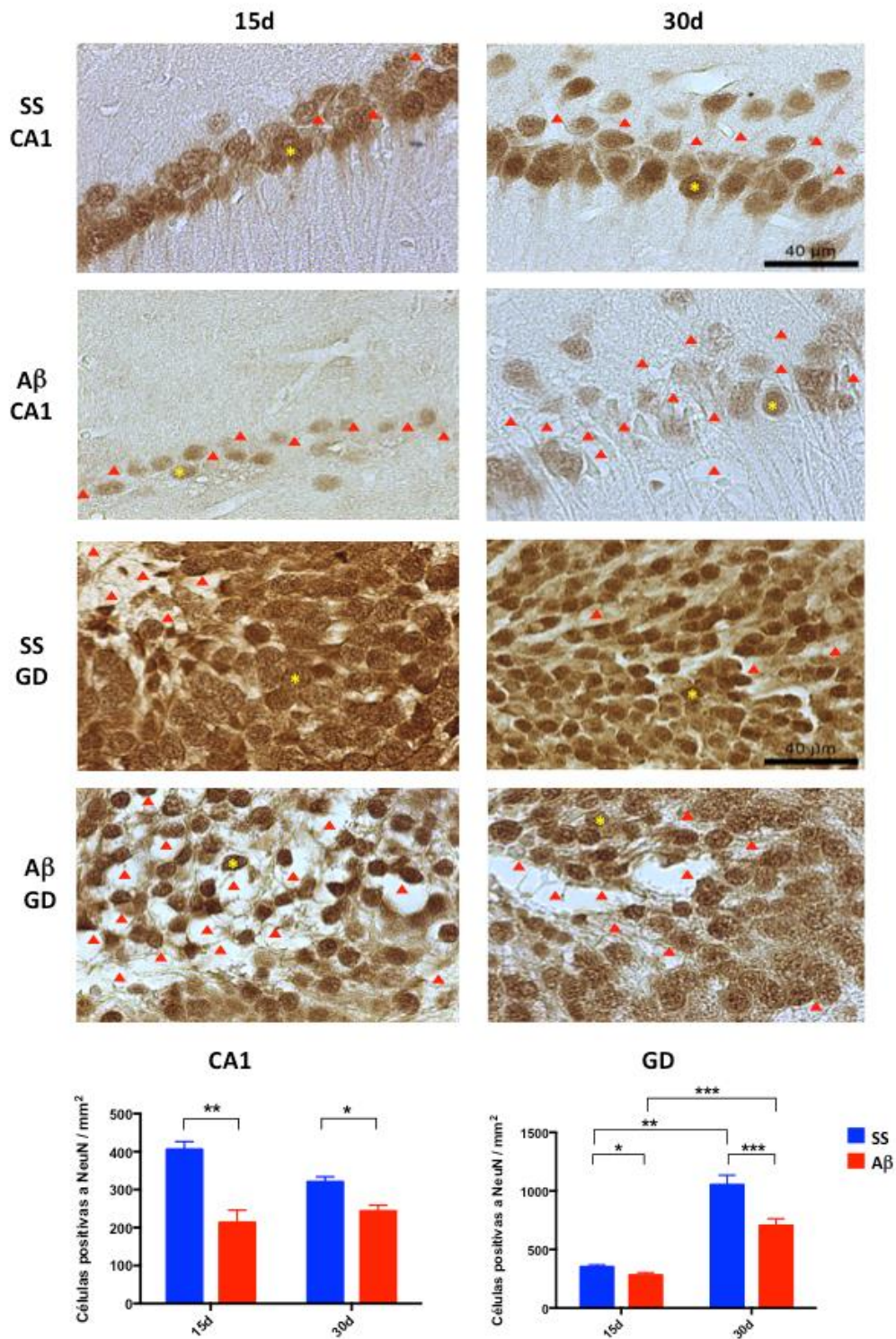


Figura 11. Cuantificación de neuronas maduras. Las secciones del cerebro fueron sometidas a una IHC, utilizando el anticuerpo anti-NeuN. Se evaluaron las regiones CA1 y GD de ratas sacrificadas, a los 15 y 30 días posteriores a la microinyección de SS o Aβ. Parte superior: Las imágenes representativas (40x, barra de escala de 40 μm) muestran, que los Aβ0 favorecen la pérdida de neuronas en ambas regiones (con un asterisco amarillo, se señala una célula positiva para NeuN en cada imagen; las cabezas de flecha rojas representan espacios de aparente pérdida neuronal). Parte inferior: El análisis cuantitativo (n= 3) sugiere una recuperación del número de células positivas a NeuN en el GD, entre los días 15 y 30. En las gráficas se muestra el promedio de células positivas a NeuN/mm², con barras de SEM. Los niveles de significancia se encuentran marcados como * p < 0.05, ** p < 0.01 y *** p < 0.001.

6.3 Respuesta celular aguda y crónica mediada por A β O

En una de las hipótesis sobre la toxicidad de los oligómeros A β se implica a la activación glial, la cual establece un microambiente inflamatorio que favorece la neurodegeneración. Por esta razón, evaluamos mediante inmunofluorescencia la presencia de células microgliales con el anticuerpo anti-Iba1, la presencia de astrocitos reactivos mediante el anticuerpo anti-GFAP y finalmente se detectaron las neuronas maduras con el anticuerpo Anti-NeuN.

En la Figura 12, se muestran imágenes representativas de la región del GD del hipocampo, donde se aprecia la respuesta celular aguda, dichas imágenes fueron seleccionadas a partir de los experimentos de microinyección en ratas (n=4). Podemos observar que, a las 18h, los oligómeros de A β (Figura 12B) promueven un aumento de células positivas a GFAP e Iba1, mientras que las células positivas a NeuN sufren una ligera disminución, cuando se comparan con los tejidos de ratas tratadas con solución salina (Figura 12A). Como podemos apreciar a las 18 horas, la lesión mecánica por sí sola en el grupo de control, provoca un aumento en el número de astrocitos y de células microgliales. Sin embargo, en el grupo tratado con A β O, se observa un mayor número de células positivas a Iba1, que, además presentan una morfología ramificada con abundante citoplasma y pocas células esféricas. También fue posible apreciar un mayor número de células positivas a GFAP con forma hipertrófica. Estos cambios morfológicos son signos de activación glial. Al comparar los grupos control a las 18 y 72h posteriores a la cirugía, se pudo observar una disminución en el número de células positivas a GFAP e Iba1 (Figura 12C). Sin embargo, el tratamiento con oligómeros de A β (Figura 12D) continúa favoreciendo el predominio de células positivas a GFAP e Iba1, manteniendo la morfología activada, mencionada previamente. Esos cambios indican una disminución en la densidad neuronal del GD así como de una disminución muy evidente de la población neuronal positiva a NeuN.

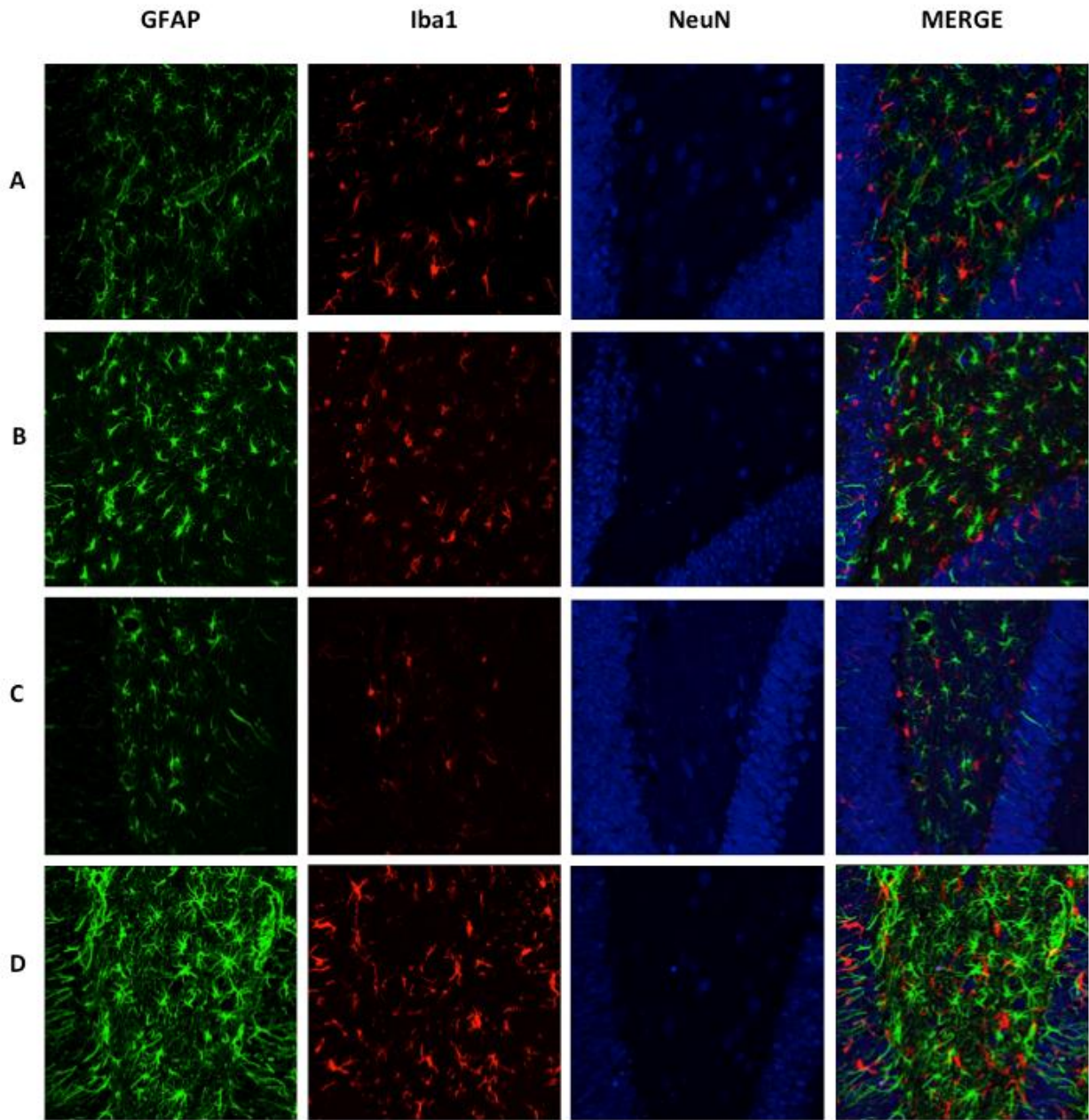


Figura 12. Respuesta celular aguda mediada por A β O. Se realizó una inmunotinción para detectar por microscopía de fluorescencia a neuronas maduras (Anti-Neun, Cy5), astrocitos (Anti-GFAP, Alexa 488) y células de la microglia (Anti-Iba, Alexa 555). En la figura se muestran las imágenes representativas (40x) de la región del GD, correspondientes a los grupos: A)SS 18h, B)A β 18h, C)SS 72h y D)A β 72h. Los tratamientos con A β O (B y D), favorecen un incremento de la presencia de astrocitos y células microgliales, acompañado de una disminución gradual de la densidad neuronal en la región de GD.

En la Figura 13 se muestra la respuesta celular crónica después de 7, 15 y 30 días posteriores a la cirugía estereotáxica. En el grupo control sacrificado al día 7 (Figura 13A), se observan algunas células hipertróficas positivas a GFAP, así como una tendencia ligera de aumento en el número de células positivas a Iba1, las cuales presentan una forma ramificada e hipertrófica (Figura 13B). En el grupo tratado con A β O, puede apreciarse que el número de células hipertróficas positivas a GFAP es mayor, además de observarse una disminución considerable en el número de neuronas positivas para NeuN.

A los 15 días post-cirugía, disminuyó la presencia de astrocitos hipertróficos en el grupo control (Figura 13C) respecto al día 7 (Figura 13A). Aunque el número de células microgliales se conservó, su morfología fue predominantemente esférica, y también se manifestó una ligera disminución en la densidad neuronal del GD, comparada con el tiempo anterior. Sin embargo, al día 15 las ratas microinyectadas con formas oligoméricas de A β O (Figura 13D), presentaron prácticamente el doble de astrocitos hipertróficos y un número mayor de células microgliales hipertróficas y ramificadas. Interesantemente, algunas de estas células Iba1 positivas, se encuentran cerca de los espacios de pérdida neuronal. En este sentido, las células positivas para NeuN disminuyeron más que en el grupo control respectivo (Figura 13C) y mostraron un aumento con respecto al grupo A β O en el día 7 (Figura 13B), lo que podría estar relacionado con algunos procesos de “recuperación neuronal” en el GD.

Después de 30 días posteriores a la cirugía, en el grupo control (Figura 13E) observamos una disminución de células positivas para Iba1 y un aumento moderado de las células positivas a GFAP en comparación con el grupo control de 15 días (Figura 13C). En contraste, la administración de A β O después de 30 días (Figura 13F), promueve la presencia de un mayor número de células positivas a Iba1 con forma esférica o ameboide. Sin embargo, aunque la inmunorreactividad a GFAP es similar al grupo control; observamos más astrocitos hipertróficos en el grupo administrado con A β O. De la misma manera, el marcaje para NeuN disminuye (Figura 13D), la estructura del GD se observó más conservada. Este resultado también se correlaciona con el fenómeno de recuperación propuesto en la cuantificación de NeuN entre los 15 y 30 días (Figura 11).

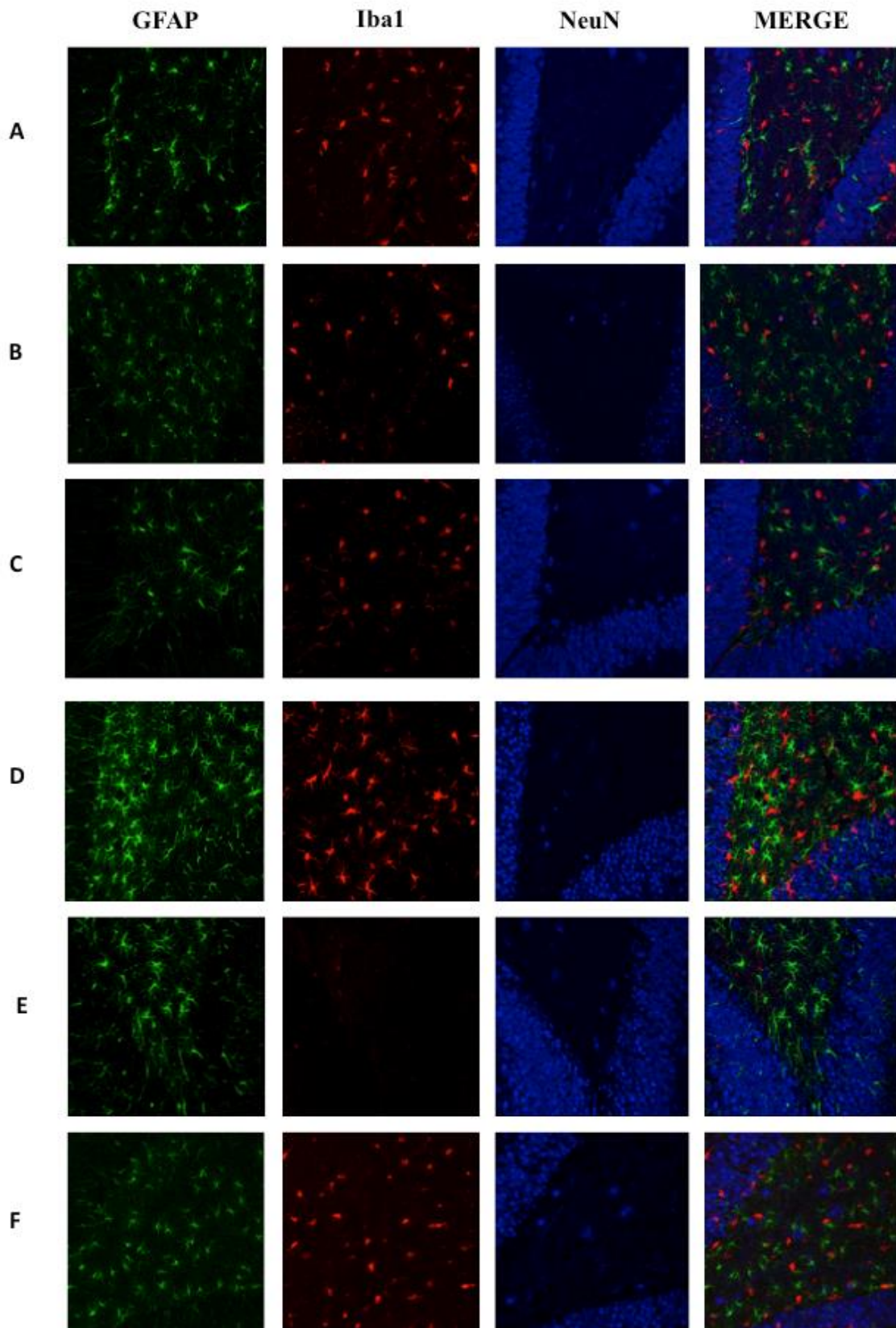
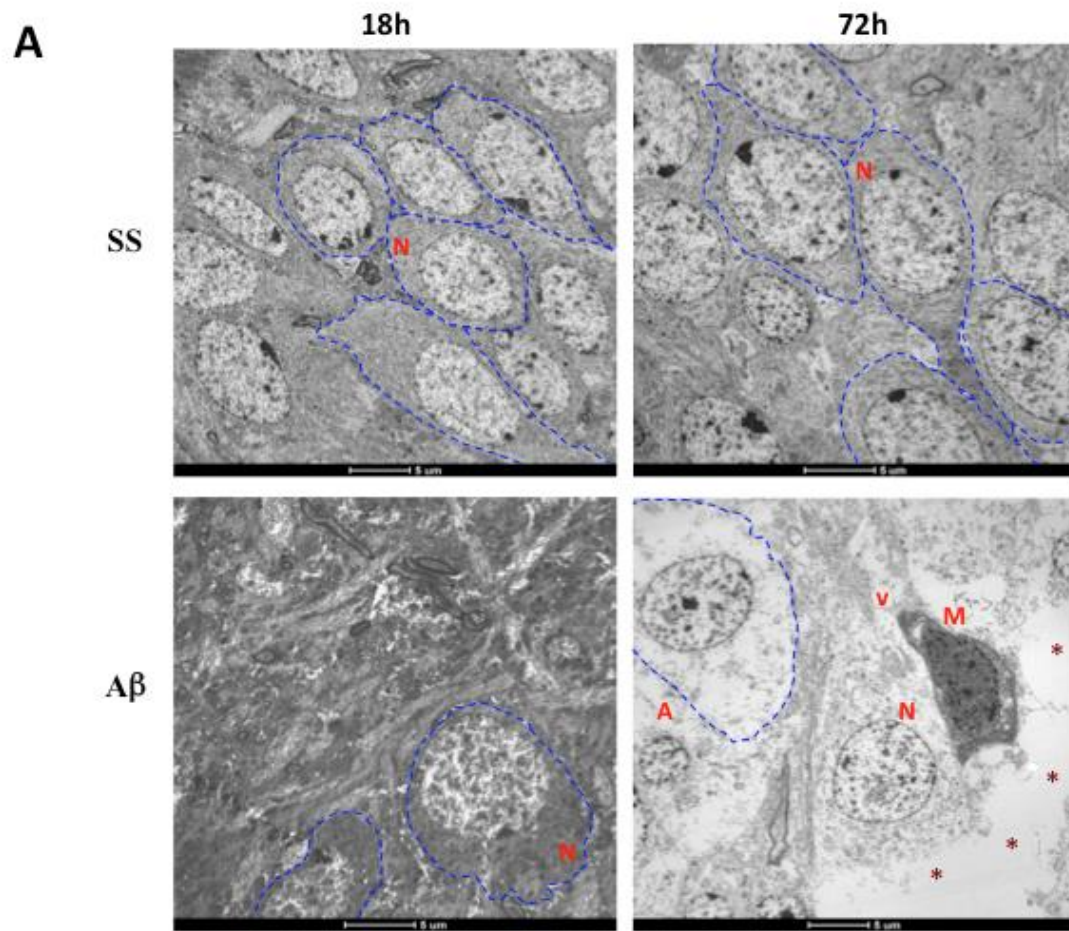


Figura 13. Respuesta celular crónica mediada por A β O. Se realizó una inmunotinción para detectar por microscopía de fluorescencia a neuronas maduras (Anti-Neun, Cy5), astrocitos (Anti-GFAP, Alexa 488) y células de la microglia (Anti-Iba, Alexa 555). En la figura, se muestran las imágenes representativas (40x) de la región del GD, correspondientes a los grupos: A)SS 7d, B)A β 7d, C)SS 15d, D)A β 15d, E)SS 30d y F)A β 30d. En las ratas tratadas con A β (B, C y D), se observa un incremento en la presencia de astrocitos hipertróficos. Además, en dichos tratamientos se observa una activación intermitente de células microgliales, acompañado de una disminución en la densidad neuronal en GD.

6.4 Análisis Ultraestructural

Como es conocido, las formas oligoméricas de A β , favorecen la activación de múltiples mecanismos celulares. La microscopía electrónica de transmisión nos ayudó a analizar el curso temporal de las alteraciones ultraestructurales, para tales efectos se analizaron 3 microcortes del hipocampo de 3 ratas por tiempo y tratamiento. En la figura 14, se muestran las imágenes representativas de las alteraciones observadas en las ratas microinyectadas con A β O, comparadas con la ultraestructura observada en el hipocampo de las ratas control.

Respecto a los hallazgos observados en la tinción con FJB, los oligómeros A β favorecieron una evidente pérdida neuronal en las ratas sacrificadas a las 18 h comparadas con lo observado en el grupo de control, en donde la ultraestructura celular se encontró bien conservada (Figura 14A). A pesar del efecto de la lesión mecánica observado en el grupo control después de 72 h de la microinyección de solución salina, la ultraestructura celular y la densidad aún se conservan. De manera contraria, en las ratas tratadas con oligómeros de A β (Figura 14B) el edema derivado de la pérdida neuronal fue evidente, así como la vacuolización del neuropilo. Además, las neuronas sufrieron alteración citoplasmática muy evidente, acompañada de pérdida en la estructura de los organelos, como lo son el retículo endoplásmico y mitocondrias. Por otro lado, también detectamos astrocitos hipertróficos y células microgliales con abundantes vacuolas que se encuentran rodeando zonas de degeneración neuronal. Estos hallazgos correlacionan con la morfología de células activadas, previamente descrita por inmunofluorescencia. Otras alteraciones encontradas en ratas tratadas con A β O, son la presencia de mitocondrias hipertróficas, que presentan además fragmentación de las crestas, degeneración axonal y fibras de tipo amiloide, las cuales no son observadas en su respectivo grupo control.



B

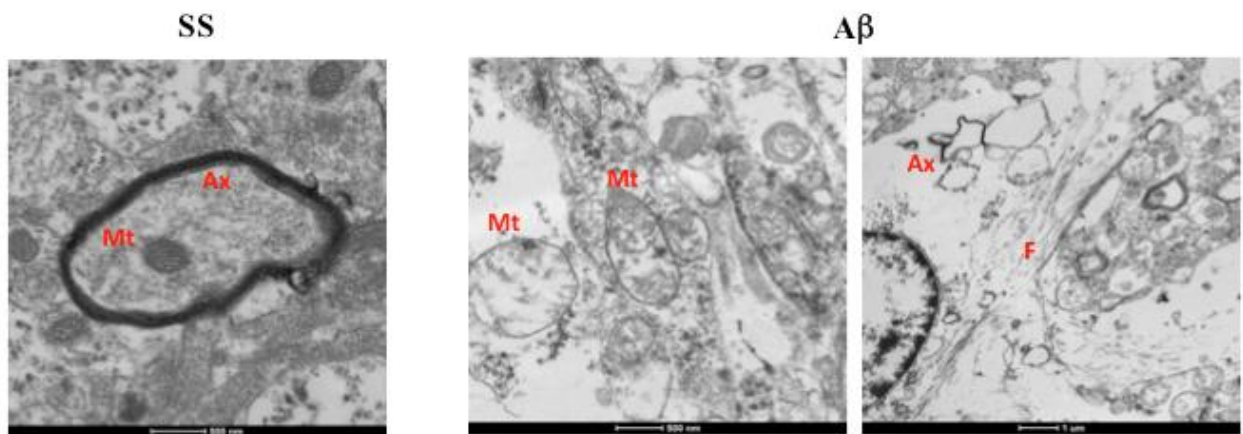


Figura 14. Análisis ultraestructural de alteraciones agudas. A: se muestran micrografías electrónicas de transmisión de 18 h y 72 h (barra de escala: 5 μ m). Las líneas discontinuas azules, identifican al menos una neurona (N) en cada imagen. Después de 18 h, los A β O favorecen la disminución de la densidad neuronal. A las 72 h, los espacios de pérdida neuronal son evidentes (asteriscos rojos), se pueden visualizar astrocitos hipertróficos (A) y células microgliales vacuoladas (M) en las ratas microinyectadas con A β . B: Las micrografías electrónicas amplificadas del grupo A β a las 72 h, muestran la presencia de mitocondrias (Mt) hipertróficas, degeneración de axones (Ax), vacuolas en el neuropilo (v) y algunas fibras (F).

Las alteraciones ultraestructurales mencionadas anteriormente, se mantuvieron tras la microinyección de A β O a los 7, 15 y 30 días posteriores a la cirugía. El grupo control sacrificado al día 7 presentó algunas vacuolas en el neuropilo, sin embargo, fueron menores en comparación con el grupo A β (Figura 15A), el cual también mostró alteraciones del retículo endoplásmico, degeneración axonal, múltiples espacios de pérdida neuronal, y en la microglia se observó la presencia de vacuolas así como alteraciones citoplasmáticas. Otros cambios observados en el grupo A β O de 7 días fueron la cantidad de mitocondrias hipertróficas con ruptura de crestas en las neuronas y células microgliales activadas, esto cerca de fibras similares a amiloides (Figura 16A). Es importante señalar que estas alteraciones, fueron menores a las observadas en el grupo de ratas tratadas con A β O y sacrificadas a las 72h.

El análisis realizado en ambos grupos de animales (control y A β O) a los 15 días posteriores a la cirugía, mostró una aparente reducción en el daño ultraestructural (Figura 15B), al observarse una disminución en el número de vacuolas del neuropilo, neuronas con organelos más conservados que aquellos observados al día 7 posterior a la cirugía. Sin embargo, es importante señalar que las anomalías morfológicas encontradas en el retículo endoplásmico, la alteración del citoplasma, así como la presencia de vacuolas, se conservan en el grupo de ratas tratadas con A β O a los 15 días, aunque en menor proporción que las observadas al día 7. Otros hallazgos interesantes que permanecen son: la degeneración del axonal, la presencia de astrocitos hipertróficos, y células de la microglia con múltiples vacuolas. Todos estos cambios predominaban en regiones circundantes al daño en el grupo de ratas tratadas con oligómeros de A β (Figura 16B).

Aunque a los 30 días, la recuperación ultraestructural en el grupo control continúa, fue posible observar ligeras alteraciones (Figura 15C), como la presencia vacuolas en el neuropilo. En el caso de las ratas microinyectadas con A β O y sacrificadas al día 30, se observaron células microgliales con una amplia vacuolización y, en neuronas, persistencia de la degeneración axonal, así como anomalías citoplasmáticas en algunas neuronas (Figura 16C).

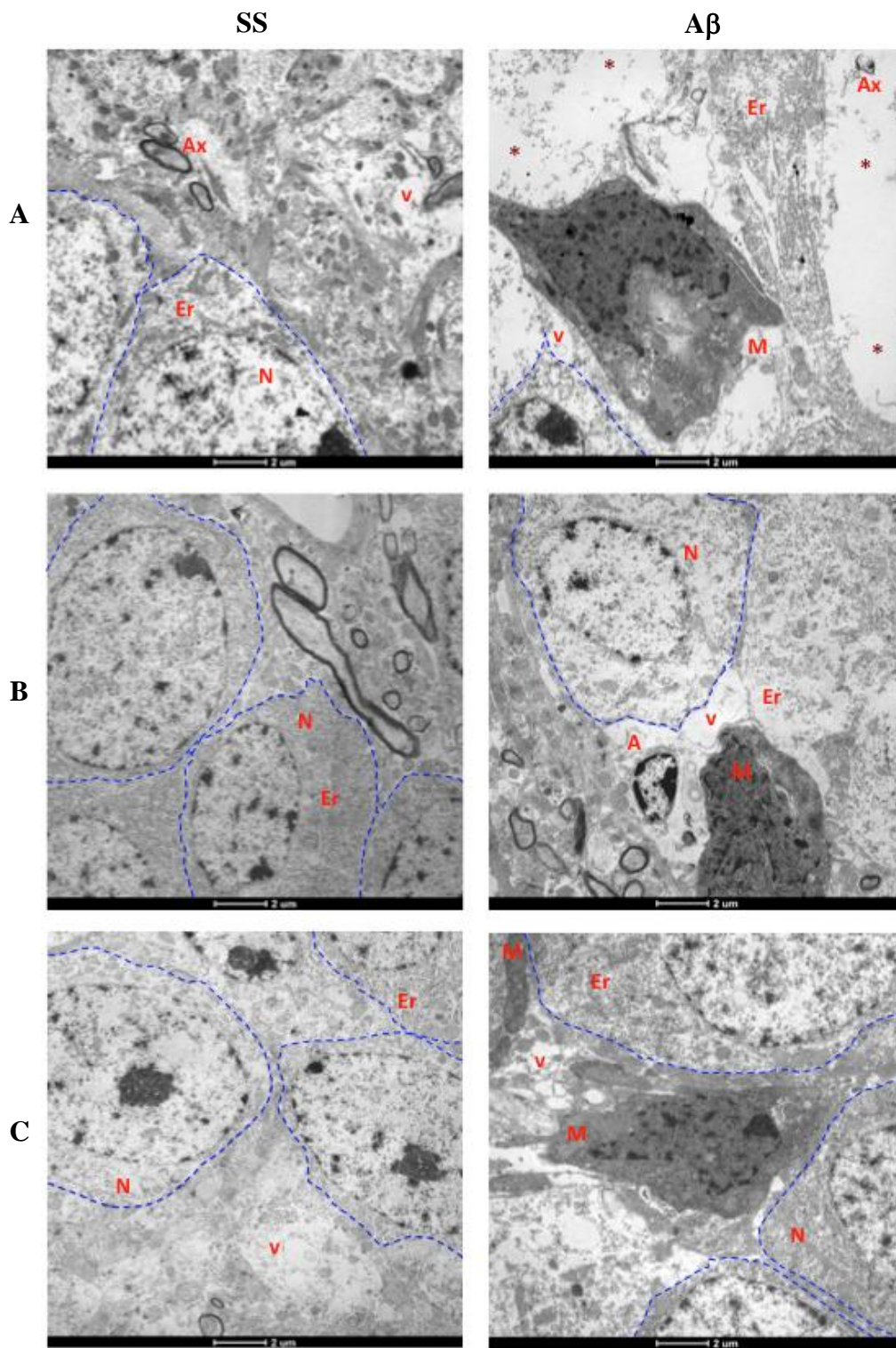


Figura 15. Análisis ultraestructural de alteraciones crónicas. En la figura se muestran las micrografías electrónicas de transmisión (barra de escala: 2 μ m) de los grupos A) 7 d, B) 15d y C) 30d. Las líneas discontinuas azules identifican al menos una neurona (N) en cada imagen. En general, el tratamiento con A β O induce la activación microglial (M), alteraciones del citoplasma y en el retículo endoplásmico (Er), en ratas sacrificadas después de 7, 15 y 30 días. En el día 7, los oligómeros favorecen un aumento de vacuolas (v) en el neuropilo y espacios de pérdida neuronal (asteriscos rojos) en comparación con el grupo control (SS). Los espacios de pérdida neuronal, disminuyen en las ratas A β sacrificadas al día 15, aunque aún se observa la presencia de astrocitos inflamados (A) y células microgliales vacuoladas. En el día 30, algunas de estas células continúan presentes en el grupo de ratas A β ; sin embargo, la pérdida de neuronas, alteraciones del citoplasma y del retículo endoplásmico disminuyen.

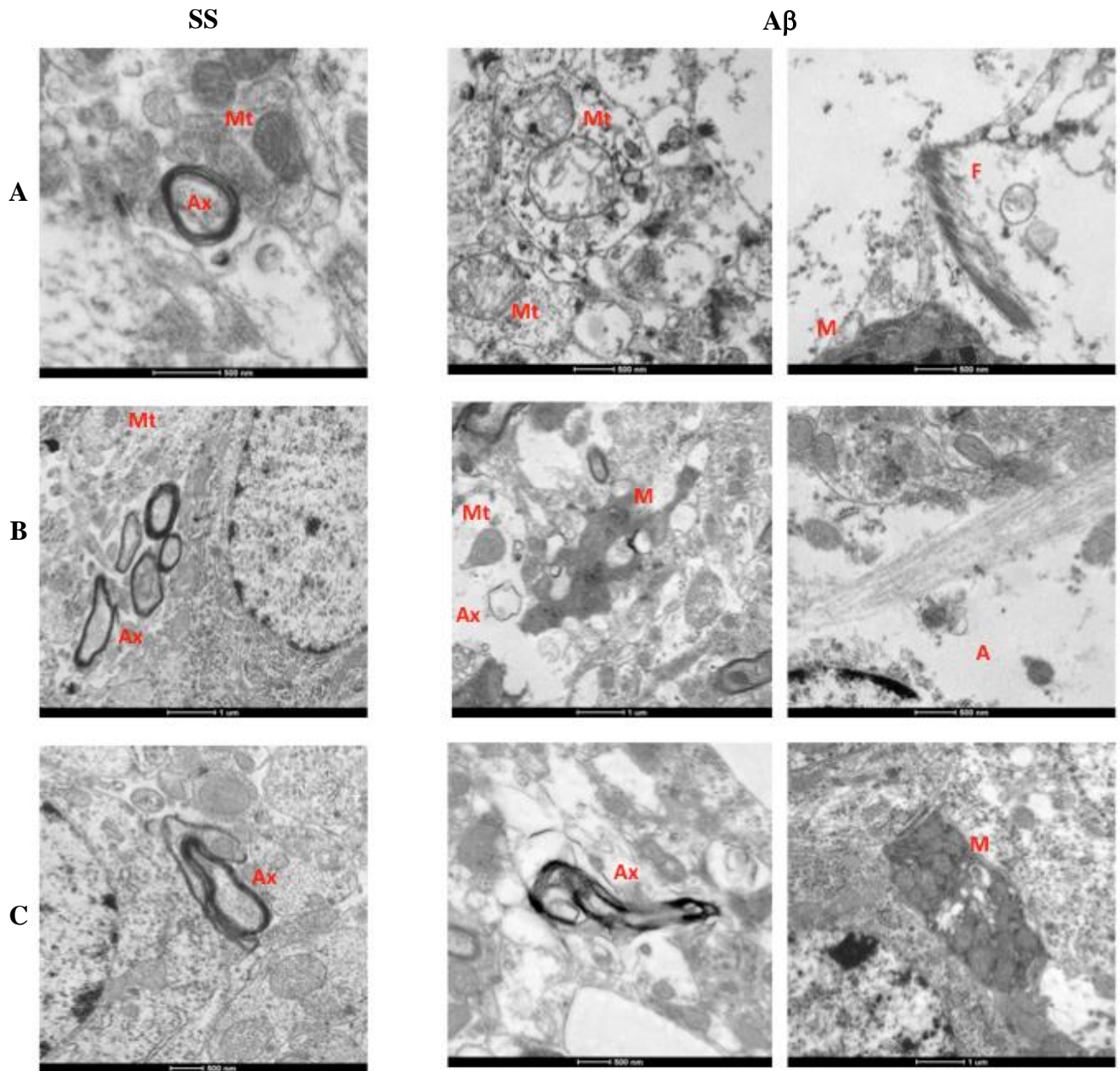


Figura 16. Alteraciones crónicas ultraestructurales adicionales. Se muestran las micrografías electrónicas representativas de los grupos de A) 7d, B) 15d y C) 30d (la barra de escala se marca en cada imagen). Algunas alteraciones crónicas presentadas por el grupo A β , a los 7 y 15 días son: Fibrillas (F), degeneración de axones (Ax), alteraciones mitocondriales (Mt) y células microgliales (M) vacuoladas. Además, a los 15d observamos algunos procesos de células de la microglia con vacuolas y astrocitos hipertróficos (A). En el día 30 después del tratamiento, las alteraciones citoplasmáticas y la pérdida neuronal disminuyen, pero persiste la activación microglial y degeneración axonal.

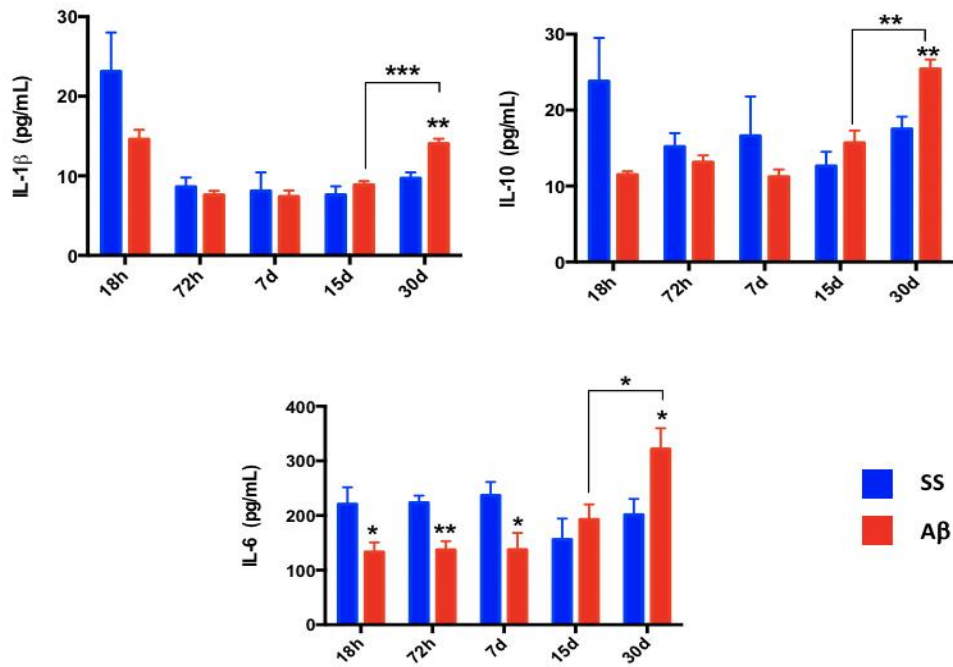
6.5 Inflamación molecular mediada por A β O.

La activación de las células gliales inducida por oligómeros de A β conduce a la liberación de distintos mediadores inflamatorios. Por esta razón, decidimos cuantificar citocinas proinflamatorias tales como IL-1 β e IL-6, así como la citocina antiinflamatoria IL-10. La cuantificación de citocinas, se realizó en homogenado de hipocampo de rata mediante la técnica de ELISA.

En ninguno de los tres gráficos de cuantificación de citocinas (Figura 17A) se observaron diferencias significativas entre las ratas microinyectadas con oligómeros de A β O al comparar con el grupo control a las 18h, 72h, 7 y 15 días. Sin embargo, podemos observar un aumento significativo en la liberación de las tres citocinas ($p < 0.01$ para IL-1 β e IL-10, $p < 0.05$ para IL-6) en aquellos animales que fueron microinyectados con oligómeros de A β y sacrificados en el día 30. Los niveles que reportamos en pg / mL del grupo control son de 9.6 ± 1.5 (IL-1 β), 201.6 ± 57.3 (IL-6) y 17.5 ± 3.2 (IL-10); mientras que, en el grupo A β fueron de 14.0 ± 1.2 (IL-1 β), 321.7 ± 75.9 (IL-6) y 25.4 ± 2.4 (IL-10). Curiosamente, los niveles de citocinas se mantuvieron sin un cambio significativo entre los grupos de 72h y 15 días en las ratas control, pero las ratas tratadas con A β presentaron un aumento estadísticamente significativo, al comparar los resultados del día 15 con el día 30 (IL-1 β $p < 0.001$, IL-6 $p < 0.05$, IL-10 $p < 0.01$).

Interesantemente, en comparación con los grupos de control respectivos, los niveles de IL-6 fueron más bajos en ratas microinyectadas con los oligómeros A β sacrificadas a las 18 h ($p < 0.05$), 72 h ($p < 0.01$) y 7 días ($p < 0.05$). Los niveles del grupo de control fueron 220.9 ± 61.7 (18h), 223.4 ± 25.9 (72h) y 236.8 ± 48.9 (7d); mientras que en el grupo A β fueron 133.0 ± 35.4 (18h), 137.1 ± 32.1 (72h) y 137.4 ± 61.6 (7d). Por consecuente, evaluamos los niveles de transcripción de IL-6 relativos mediante qPCR (Figura 17B) y, en contraste con los niveles de proteína, los niveles de ARNm de IL-6 fueron más altos en ratas tratadas con oligómeros sacrificadas después de 18 h ($p < 0.001$), 72 h ($p < 0.001$), 7 días ($p < 0.001$) y 30 días ($p < 0.01$).

A



B

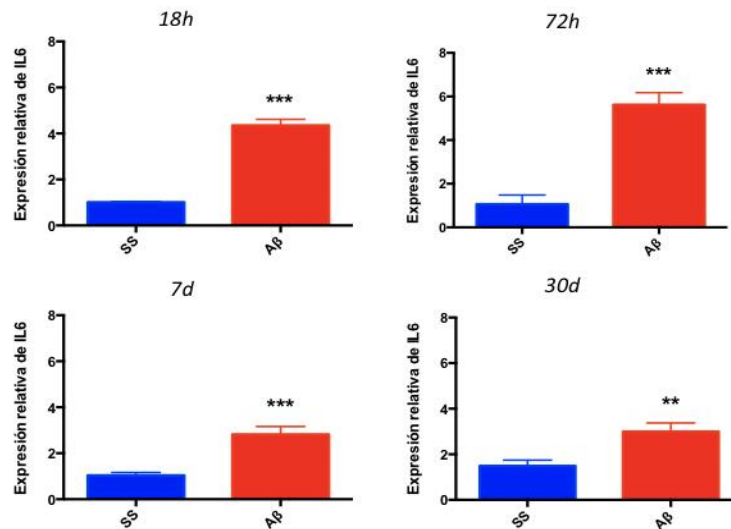


Figura 17. Cuantificación de citocinas y expresión de IL-6. A: El análisis cuantitativo en homogenados de hipocampo de rata ($n = 4$), revela una mayor liberación de IL-1 β , IL-6 e IL-10, 30 días después de la microinyección de A β O. Curiosamente, se observó una disminución en los niveles de IL-6, en los grupos de ratas A β sacrificados a las 18h, 72h y 7d. Los valores promedios de los niveles de citocinas (pg/mL) se presentan con barras de SEM.

B: El análisis por qPCR ($n = 6$), revela un aumento de la expresión relativa de RNAm de IL6 en ratas administradas con A β O, las cuales fueron sacrificadas a las 18h, 72h, 7d y 30d. La expresión de RNAm de IL6, se normalizó respecto a la expresión de β -actina. En las gráficas se representan los promedios de incrementos de expresión relativa en comparación a los controles respectivos (con barras SEM). Nivel de significancia * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

6.6 A β O promueven la expresión de STAT3 en células gliales.

Debido a que la producción de la citocina pleiotrópica IL-6, juega un papel muy importante en la inflamación y participa como activador del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3), decidimos evaluar la expresión de este activador por IHC. STAT3 es uno de los candidatos efectores más relevantes por los cuales A β , tiene la capacidad de inducir muerte neuronal en la EA [48]. Al evaluar los 2 grupos de ratas infiltradas con solución salina y A β O, a las 18h, se encontraron células positivas a STAT3 identificándose una mayor inmunoreactividad en el grupo de oligómeros respecto al grupo control (Figura 18A). La mayoría de las células que comparten esta característica, se encuentran ubicadas en el hipocampo y en la corteza cerebral. Otras alteraciones observadas en estos grupos celulares rodeados por vasos sanguíneos, sugere a una morfología de células perivasculares, que contaban con una marca nuclear del factor STAT3.

A las 72h posteriores a la microinyección (Figura 18B), en el hipocampo se observó en el hipocampo la presencia de células positivas a STAT3 que se encontraban aumentadas en el grupo que fue microinyectado con A β O. Es importante señalar que abundan células con morfología glial. Algunas de estas células presentan características celulares activas, con citoplasma hipertrófico y marca nuclear positiva a STAT3. Las células gliales mencionadas previamente, no se encontraron en el grupo control al tiempo señalado.

En el grupo control de ratas sacrificadas al día 7 (Figura 18C), se apreciaron neuronas positivas a STAT3 con predominio citoplasmático. Por otro lado, en el grupo infiltrado con oligómeros A β la expresión de STAT3 se encontraba restringida a células gliales, algunas con tinción nuclear. Vale la pena señalar, que el número de células gliales con morfología activa detectadas, aparentemente resultó más elevada en el grupo de ratas tratadas con oligómeros A β a las 72h. Estas células se localizaban preferentemente en las neuronas cercanas a la región del GD.

Los altos niveles de mRNA de IL-6 previamente mencionados (Figura 17B), correlacionan con la expresión elevada de STAT3 en el grupo de ratas A β O, y sacrificadas a las 18h, 72, y 7días (Figura 18). Estos resultados podrían sugerir la activación de la vía de señalización JAK-STAT, pese a los niveles disminuidos de la citocina encontrados a estos tiempos (Figura 17A).

La expresión de STAT3 al día 15, resultó similar a la observada que en los tiempos anteriores, presentándose una alta inmunoreactividad positiva en células con forma glial en las regiones CA1 Y GD (Figura 18D). Muchas de estas células gliales, presentaron una morfología hipertrófica, que no fue identificada en el grupo control respectivo.

Finalmente, en el grupo control de ratas sacrificadas al día 30 se detectaron pocas células gliales positivas a STAT3 (Figura 18E). Sin embargo, en el grupo de ratas microinyectadas con A β O y sacrificadas a los 30 días, presentaron un mayor número de células positivas a STAT3 en el hipocampo se encontró incrementado; algunas de estas células conservaban su morfología activa y tinción nuclear. Finalmente cuando comparamos las imágenes representativas de las ratas tratadas con A β O a los 30 días y 72h, el número de células gliales positivas para STAT3, es menor en estos tiempos que podemos considerar como una respuesta crónica.

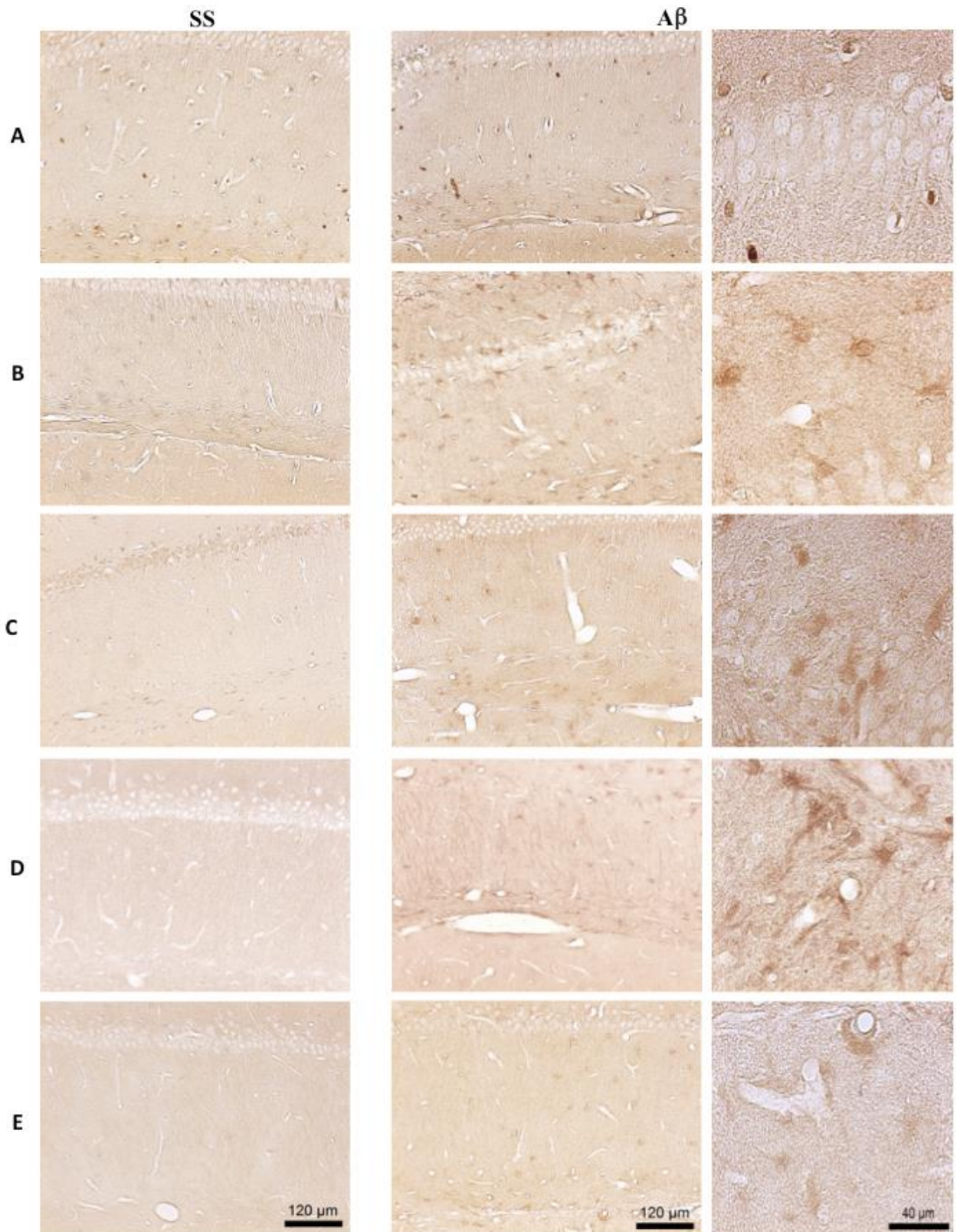


Figura 18. Expresión del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) en el hipocampo. Las imágenes representativas de IHC (barra de escala = 120 μm , para imágenes al 10x y 40 μm , para la ampliación de 40x en los grupos A β O), muestran una mayor expresión de STAT3 mediada por A β O a las A) 18h, B) 72h, C) 7d, D) 15d y E) 30d, posteriores a la microinyección. A partir de las 72h, se pudieron identificar células positivas a la tinción con morfología glial, las cuales adquieren una morfología hipertrófica a partir en el día 7. Algunas de estas células, presentan una tinción nuclear positiva a STAT3.

Con la finalidad de identificar de manera más precisa la localización del factor STAT3 en neuronas y células gliales, se llevó a cabo una inmunofluorescencia en tejido de ratas a las 72 h y 7 d; tiempos donde previamente se había detectado una considerable muerte neuronal. A las 72h, en las ratas tratadas con A β O (a diferencia de las ratas control) (Figura 19 B), se observó un mayor número de astrocitos STAT3 positivos con una tinción nuclear y citoplásmica. De manera interesante, en el día 7 se lograron identificar neuronas positivas al marcaje en la región CA1 del hipocampo y algunos astrocitos con tinción nuclear en las ratas tratadas con A β O (Figura 19C). Estos hallazgos no pudieron observarse en las imágenes de IHC. En contraste, en las ratas control (Figura 19D) se pudieron observar neuronas positivas a STAT3 con marca citoplásmica, en la misma región y día analizado.

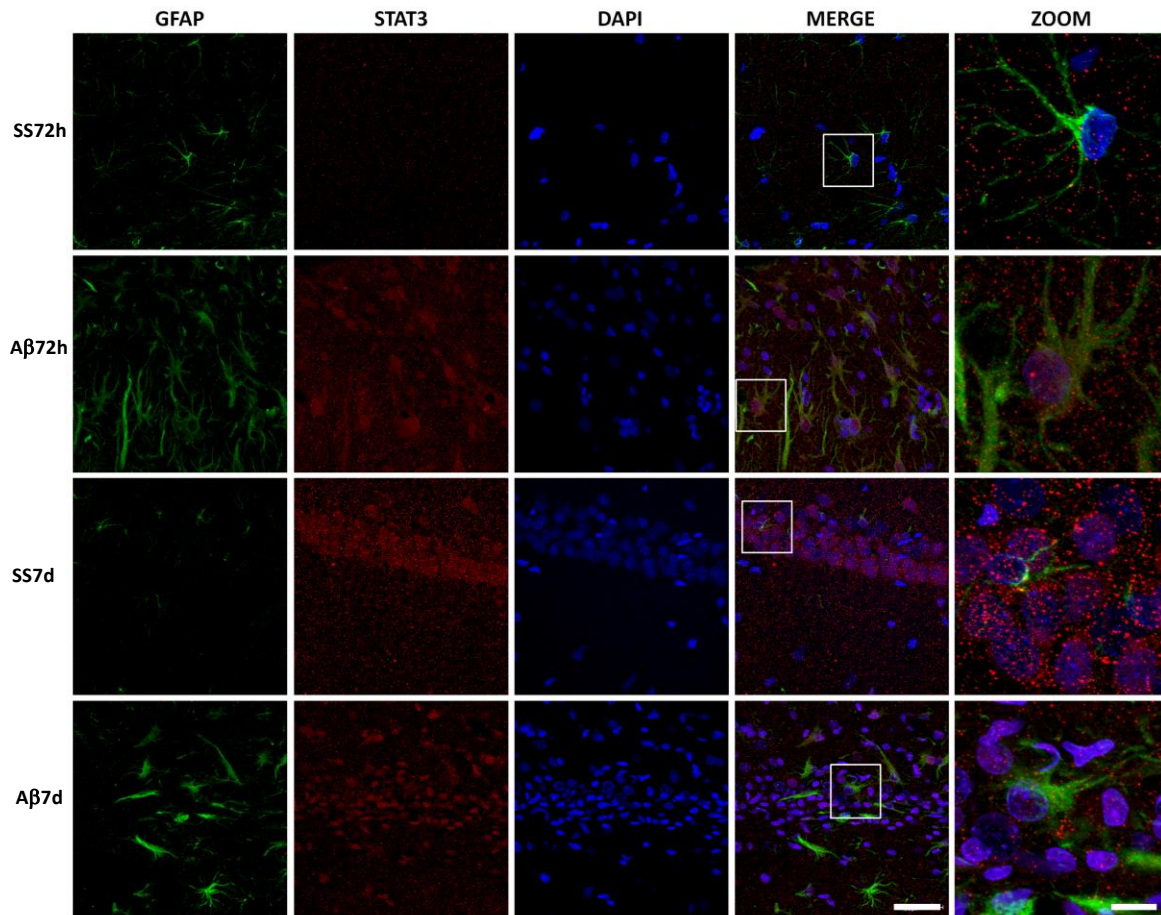


Figura 19. Expresión de STAT3 en astrocitos y neuronas. Las imágenes representativas de inmunofluorescencia (Barra de escala de imágenes en 63x= 40 μ m, zoom= 10 μ m) muestran una expresión nuclear del factor de transcripción STAT3 (Alexa 555) en astrocitos GFAP positivos (Alexa 488), en las ratas tratadas con A β y sacrificadas a las 72h posteriores a la microinyección. En el día 7, se observa un marcaje diferencial de factor STAT3, en el grupo control se observa una inmunotinción citoplásmica en neuronas y en el grupo tratado con A β , la tinción es nuclear inclusive en algunos astrocitos.

6.7 Relación entre la expresión de STAT3 en células gliales mediada por A β O y la muerte neuronal.

El incremento en la expresión del factor STAT3 observado en los tratamientos de A β O en astrocitos y neuronas, nos hizo cuestionar el papel de la vía de señalización JAK2/STAT3 en el proceso de muerte neuronal favorecida por la inflamación. Por tal motivo, realizamos un ensayo de inhibición para evaluar la expresión de STAT3 en neuronas y astrocitos expuestos a A β O. Teniendo en cuenta nuestros resultados anteriores, decidimos exponer un cultivo primario de hipocampo durante 72 h, a una concentración tóxica de oligómeros del péptido A β (20 μ M). El tiempo de exposición a los oligómeros, se seleccionó tomando en cuenta el incremento en la expresión de STAT3 en astrocitos, previamente observada en el modelo animal. Los resultados del ensayo de inhibición fueron evaluados mediante inmunotinción y microscopía confocal, en donde se evaluó la expresión de STAT3 total en astrocitos y neuronas.

Como primera estrategia utilizamos el inhibidor AG490, el cual inhibe a JAK2, una de las cinasas responsables en modular la fosforilación y activación de STAT3. Para evaluar su efecto en los cultivos primarios, se emplearon dos concentraciones, 25 y 50 μ M, basados en la IC50 reportada para el compuesto que es de 25 μ M. Los resultados obtenidos a 25 μ M, mostraron que no hubo cambios significativos en la expresión de STAT3 total, entre los diferentes tratamientos (Figura 20). Sin embargo, de manera interesante en el tratamiento con 25 μ M de AG490, en cultivos expuestos a A β O, pudimos observar una aparente disminución en el engrosamiento de los procesos astrocíticos, en comparación con los cultivos tratados únicamente con A β O. Este último cambio es característico de una reducción de la morfología activa de los astrocitos.

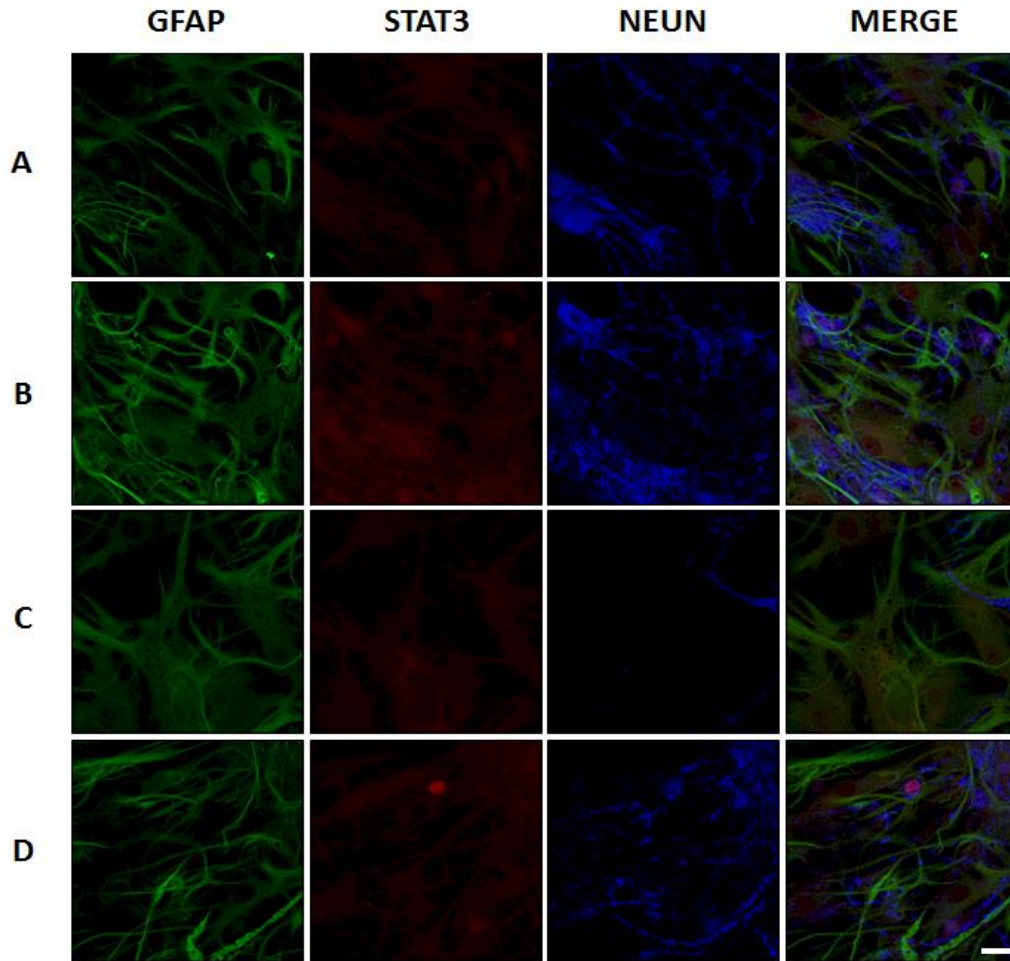


Figura 20. Inhibición de JAK2 con 25 μM de AG490. En la figura se muestran las imágenes representativas de inmunofluorescencia (Barra de escala de imágenes en $40\times=40\ \mu\text{m}$) del ensayo de inhibición en cultivos primarios de hipocampo de rata a 72 h de adicionar los tratamientos A) Vehículo, B) AG490 25 μM , C) A βO 20 μM y D) AG490+A βO . Se identificó la expresión de STAT3 total (Alexa 555), a los astrocitos con GFAP (Alexa 488) y a las neuronas con NeuN (Cy5). El inhibidor AG490 no promovió cambios significativos en la expresión total de STAT3, sin embargo, favoreció una menor pérdida neuronal en los cultivos expuestos sólo a A βO .

A diferencia del ensayo anterior, 50 μM de AG450 en cultivos expuestos a A βO , promovió una reducción evidente en la expresión de STAT3 total (Figura 21 D), en comparación con la expresión detectada en los cultivos expuestos únicamente al tratamiento con oligómeros (Figura 21 C). De la misma manera, se observó un cambio en la morfología de los astrocitos como en el ensayo con 25 μM de AG490, sin embargo, el número de neuronas fue menor que en el cultivo solamente expuesto a A βO .

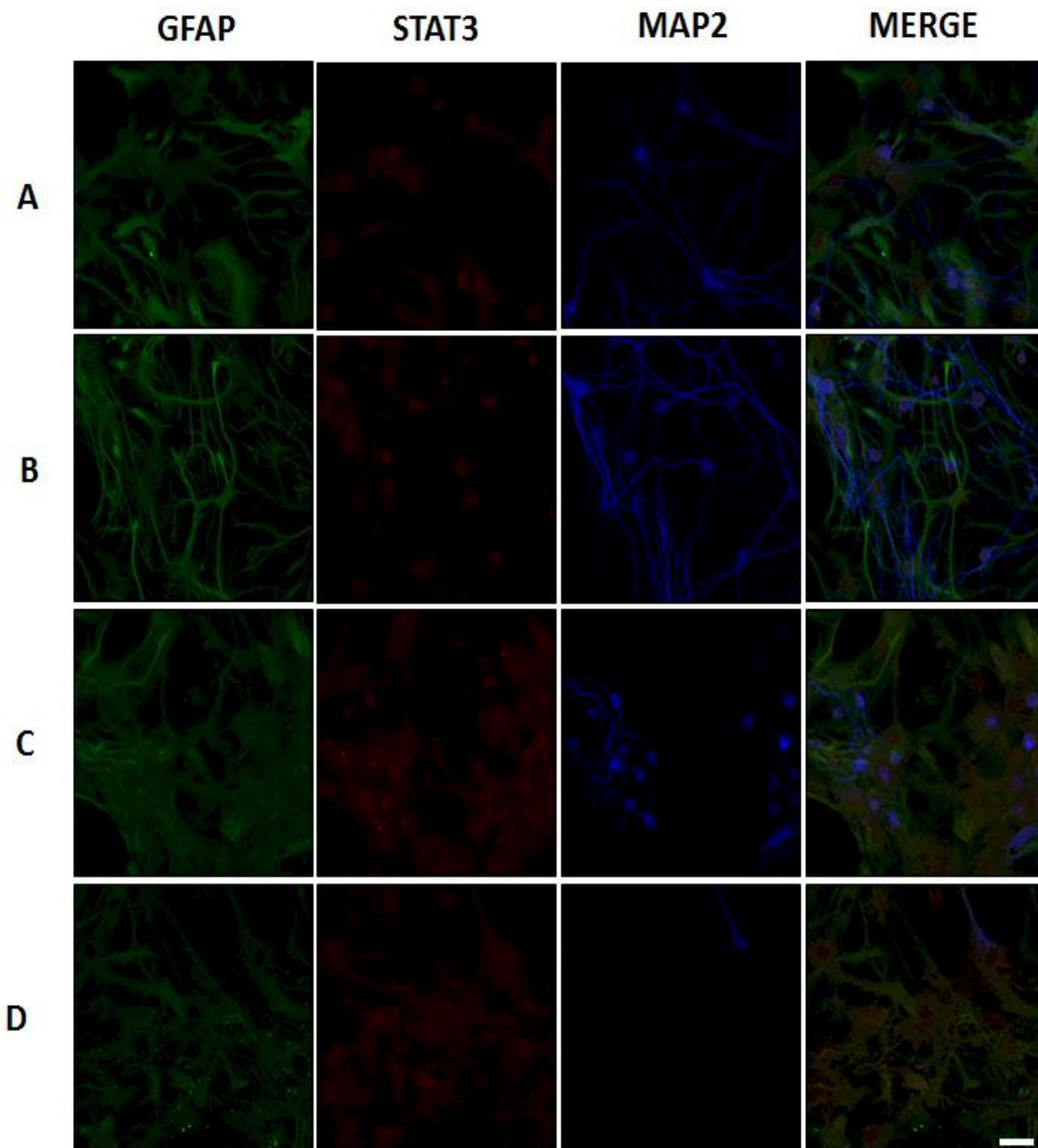


Figura 21. Inhibición de JAK2 con 50 μM de AG490. En la figura se muestran las imágenes representativas de inmunofluorescencia (Barra de escala de imágenes en 40x= 40 μm) del ensayo de inhibición en cultivos primarios de hipocampo de rata a 72 h de adicionar los tratamientos A)Vehículo, B)AG490 50 μM , C) $\text{A}\beta\text{0}$ 20 μM y D)AG490+A β0 . Se identificó la expresión de STAT3 total (Alexa 555), a los astrocitos con GFAP (Alexa 488) y a las neuronas con MAP2 (Cy5). El uso de 50 μM de AG490 en cultivos expuestos a $\text{A}\beta\text{0}$, favoreció un cambio de morfología en los astrocitos y una disminución en el número de neuronas.

Aunque los resultados obtenidos con AG490, muestran cambios interesantes en la morfología de los astrocitos, que sugieren una disminución en su estado de activación; no se logró obtener una inhibición adecuada de la expresión total de STAT3. Por este motivo, decidimos realizar nuevos ensayos con Stattic, una molécula que inhibe la fosforilación y la subsecuente activación de STAT3 [32]. De manera inicial, diseñamos una curva para determinar la concentración óptima de inhibición, que además preservara la viabilidad celular en los cultivos (Figura 22). Para ello tomamos como base la IC50 de Stattic que es de 5.1 μM y en un primer ensayo de inhibición, probamos las siguientes concentraciones: 5, 10 y 20 μM . Stattic redujo la expresión total de STAT3 de una manera dosis dependiente (Figura 22C-E). La expresión de STAT3 en los cultivos expuestos a las diferentes concentraciones de Stattic, fue comparada con el cultivo expuesto al vehículo (Figura 22A) y a A β O (Figura 22B).

Como podemos observar las concentraciones 10 y 20 μM de Stattic, produjeron un efecto deletéreo en la supervivencia neuronal (células positivas para MAP2) y de los astrocitos (células positivas para GFAP). Por esta razón, seleccionamos la concentración de 5 μM , para probar su efecto en cultivos expuestos a A β O.

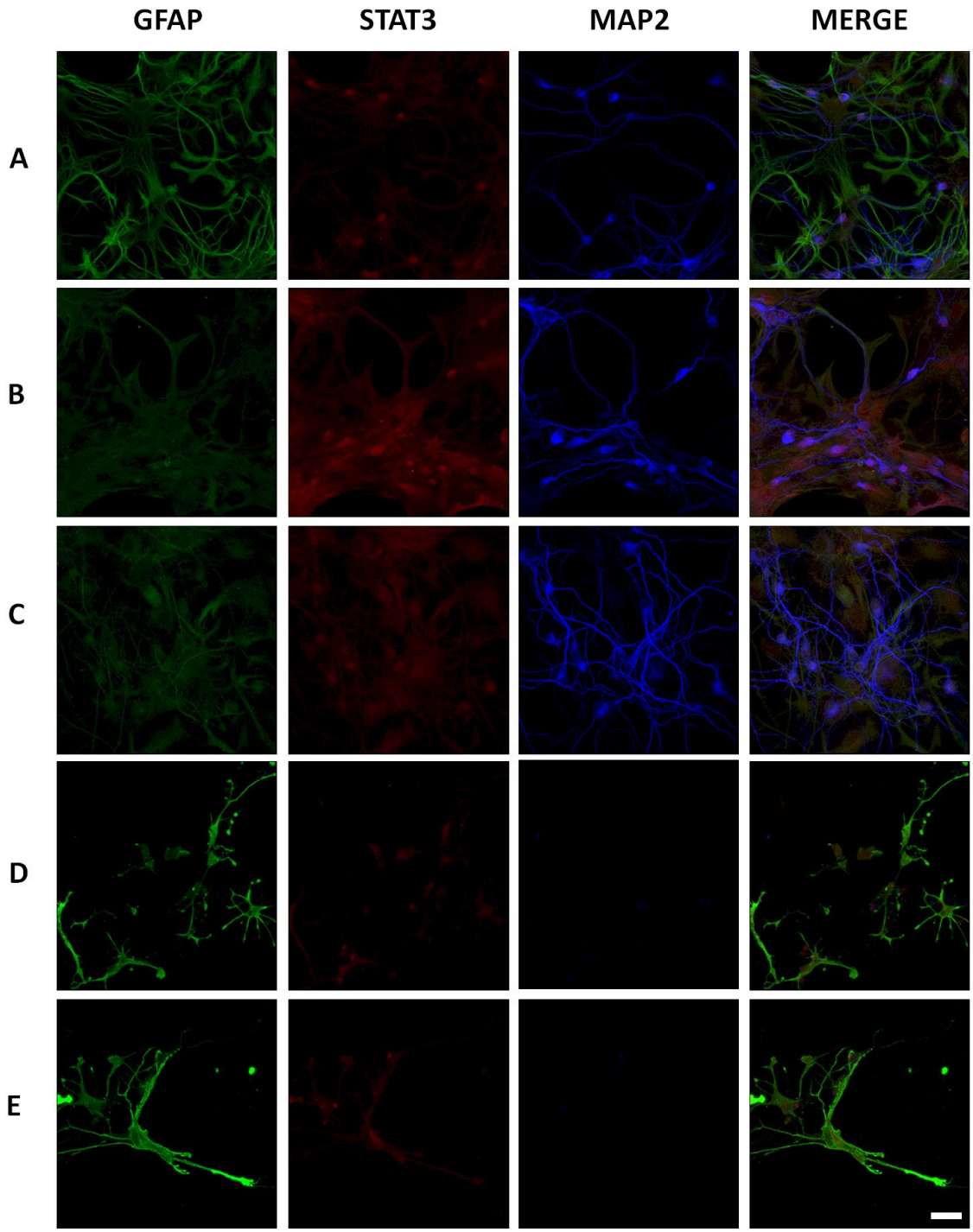


Figura 22. Efectos del inhibidor Stattic en cultivo primario de hipocampo de rata. En la figura se muestran las imágenes representativas de inmunofluorescencia (Barra de escala de imágenes en 40x= 40 μm) del ensayo de inhibición de Stattic en las concentraciones de 5 (C), 10 (D) y 20 μM (E), que fueron contrastadas con los tratamientos vehículo (A) y de AβO (B). La expresión total de STAT3 (Alexa 555) disminuyó en astrocitos identificados con GFAP (Alexa 488) y neuronas identificadas con MAP2 (Cy5), de manera directa al incrementar la concentración del inhibidor, en comparación con el cultivo expuesto a AβO. En las dosis de 10 y 20 μM, se observó una disminución del número de neuronas y astrocitos.

Los resultados obtenidos del ensayo de inhibición con 5 μM de Stattic (Figura 23), muestran que los cultivos celulares expuestos a dicho inhibidor (Figura 23B) presentaron una expresión de STAT3 total, similar a la expresión observada con vehículo (Figura 23A). Asimismo, se conservó la morfología de astrocitos (GFAP) y neuronas (MAP2) en ambos tratamientos. Por el contrario, al exponer los cultivos primarios a A β O (Figura 23C), se identificó un aumento de la expresión de STAT3 total, en células positivas a GFAP y como efecto adicional, en este tratamiento se presentó muerte de las neuronas del cultivo. Al añadir el inhibidor previo a la exposición del cultivo a A β O (Figura 23D), se promovió una disminución de la expresión de STAT3 en los astrocitos. Además de estos cambios, el inhibidor evitó la muerte neuronal en el cultivo.

Con la finalidad de corroborar los cambios observados en las imágenes de microscopía confocal, se realizó el análisis de densidad integrada de la intensidad de fluorescencia, para cuantificar la expresión de STAT3 total. En un análisis general de los diferentes tratamientos, se detectó una densidad integrada más alta de la expresión de STAT3 en cultivos celulares tratados con A β O ($p < 0.05$) en comparación con los demás tratamientos Vehículo, Stattic y Stattic+A β O (Figura 23E). Posteriormente, se obtuvo la densidad integrada en astrocitos positivos a GFAP (Figura 23F). En los cultivos expuestos a A β O, los astrocitos presentaron una mayor densidad integrada de inmunofluorescencia de STAT3 total que la observada en los tratamientos Vehículo, Stattic y Stattic+A β O ($p < 0.05$). En contraste, en el análisis de densidad integrada de la expresión del factor de transcripción en las neuronas, identificamos una reducción significativa en la densidad integrada de STAT3 total en cultivos tratados con A β O ($p < 0.05$) en comparación con los demás tratamientos (Figura 23G).

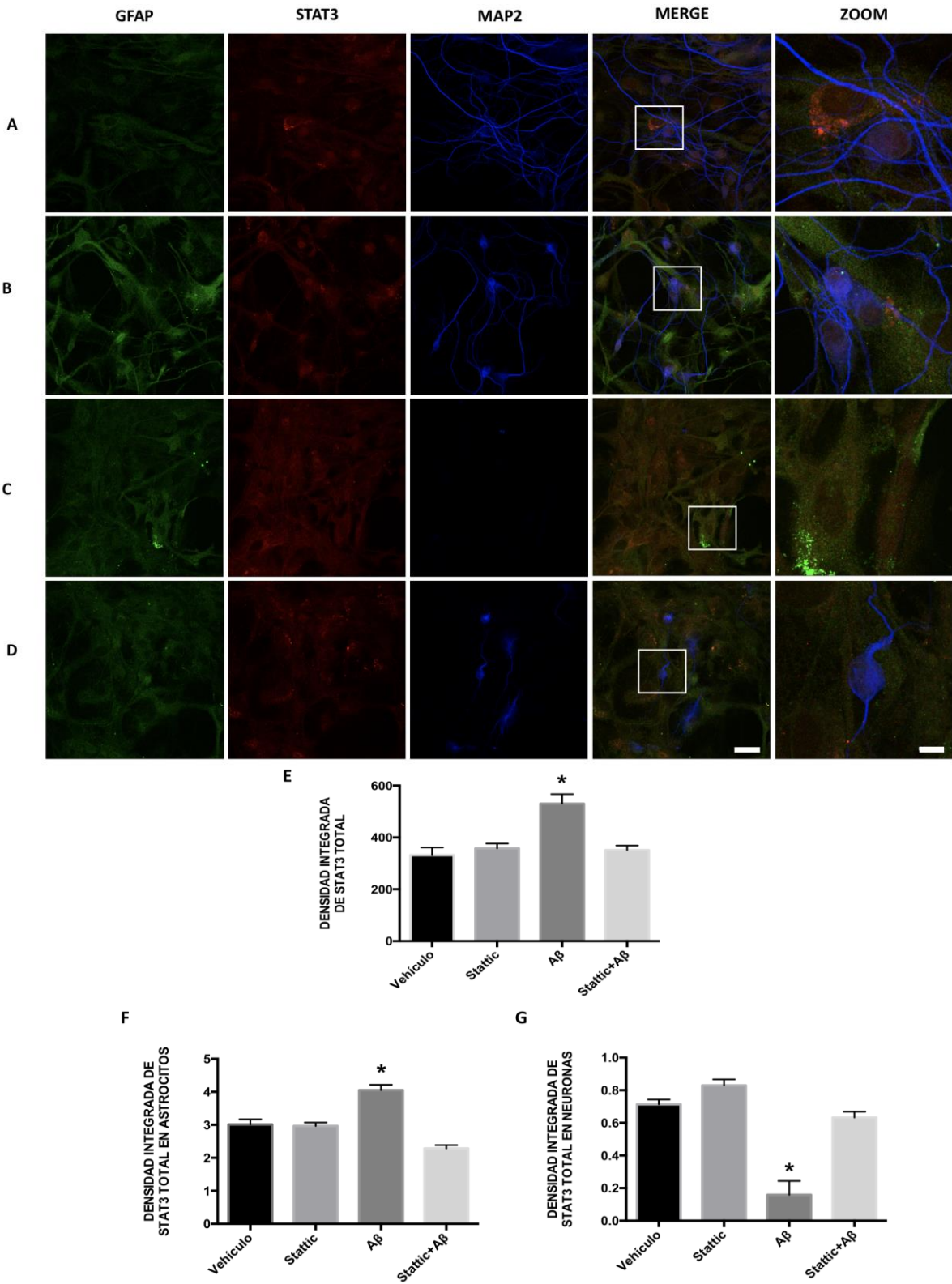


Figura 23. Ensayo de inhibición con Stattic 5 μ M en cultivo primario de hipocampo. En la figura se muestran las imágenes representativas de inmunofluorescencia (Barra de escala 40x imágenes= 40 μ m, zoom= 10 μ m) del ensayo

de inhibición en cultivos primarios de hipocampo de rata a 72 h de adicionar los tratamientos A)Vehículo, B)Stattic 5 μ M, C)A β O 20 μ M y D)Stattic+A β O. Se identificó la expresión de STAT3 total (Alexa 555), a los astrocitos con GFAP (Alexa 488) y a las neuronas con MAP2 (Cy5). E) Los valores de densidad integrada de la intensidad de fluorescencia para la inmunoreactividad del anticuerpo STAT3 total (Media \pm desviación estándar de la media, n=4), fueron analizados en los 4 tratamientos del ensayo, identificándose un valor mayor en el tratamiento con A β O (*p<0.05). F) De la misma forma, se graficaron los valores de densidad integrada de STAT3 en astrocitos analizados para cada tratamiento (Media \pm desviación estándar de la media, n=4, 4 astrocitos por muestra), siendo mayor la densidad integrada en el tratamiento A β O (*p<0.05). G) Finalmente, se analizaron los valores de densidad integrada de STAT3 en neuronas (Media \pm desviación estándar de la media, n=4, 3 neuronas por muestra), en donde los valores fueron menores en el tratamiento A β O (*p<0.05). La prueba estadística utilizada fue ANOVA de una vía, seguida de la prueba.

7. DISCUSIÓN

En la actualidad, se han desarrollado diversos modelos genéticos, para conocer la toxicidad mediada por A β . Sin embargo, la mayoría de estos no han representado la evolución temporal de los cambios asociados con la presencia de oligómeros de A β , a lo largo de semanas o meses. Algunos autores han mostrado la relevancia de modelos no-transgénicos basados en la microinyección de oligómeros A β ya sea en el hipocampo o en la zona ventricular (ICV), utilizando roedores o primates no-humanos [133-139]. Con el objetivo de ampliar la descripción de los mecanismos moleculares gliales asociados con la toxicidad mediada por oligómeros de A β , desarrollamos un modelo de microinyección intra-hipocampo en ratas.

En la literatura se ha descrito que las fibras, o placas de A β podrían, por ellas mismas, inducir muerte neuronal. Sin embargo, otros autores han demostrado el efecto neurodegenerativo de las formas oligoméricas empleando ratones transgénicos [140], o bien microintectando de manera múltiple [39] o única el hipocampo [135], así como ICV con A β O. En un estudio realizado por Gonzalo-Ruiz y colaboradores, en el cual, aplicaban microinyecciones de A β en la corteza retro-esplénico de rata, observaron una disminución en la densidad neuronal, así como alteraciones sinápticas, principalmente aledañas al sitio de lesión [139]. En nuestro modelo una sola administración de oligómeros A β en ratas activó el proceso degenerativo a las 18h. Esto se observó principalmente en el sitio de depósito, en las neuronas de la región CA1. La degeneración neuronal fue menor en el grupo control pese a haber sufrido el mismo daño mecánico, demostrando el potencial que tienen los A β O para inducir muerte neuronal. Al analizar la evolución temporal, la neurodegeneración en CA1 permanece aumentada respecto al control a las 72h, aunque en menor medida que a las 18h.

De igual manera se observaron características sugestivas de neurodegeneración en la región del GD, esto posiblemente mediado por la presencia de depósitos de A β . Estudios previos en modelos de ratas, donde se han aplicado inyecciones de A β intra-hipocampo, han reportado la presencia de depósitos de A β en GD [135, 141]. La capacidad de propagación de los oligómeros de A β es conocida como parte de su toxicidad [41]. Estos cambios, al igual que la neurodegeneración del GD, no se observaron en las ratas control, por lo menos a las 72h con la tinción de FJB. Los resultados obtenidos mediante la cuantificación de neuronas positivas a NeuN, sugieren que A β pudiera estar mediando la pérdida neuronal del GD, en tiempos crónicos (15 y 30 días). Esta significativa pérdida

neuronal observada a los 30 días en el grupo de ratas tratadas con oligómeros, nos habla de la capacidad excepcional de A β para promover la muerte neuronal de manera crónica, y probablemente, también podría sugerir que puede afectar periodos críticos en el proceso de neurogénesis característico del GD. Esto por tanto afectaría su capacidad intrínseca de proliferación celular, tal y como ha sido reportado previamente [142]

Como mencionamos anteriormente, diferentes mecanismos neurotóxicos tanto intracelulares como extracelulares producidos por A β se han relacionado con la muerte neuronal [42-45]. Otra forma en la que A β induce muerte neuronal proviene de la proliferación y activación de astrocitos y microglia. Se ha propuesto que ambos tipos celulares podrían mediar la fagocitosis de agregados de A β , especialmente fibras, y por consecuencia, jugarían un papel “benéfico” en la enfermedad. En contraste, también se ha sugerido que el A β favorece el desarrollo de un entorno celular pro-inflamatorio, el cual, exagera aún más el proceso de neurodegeneración que a su vez, disminuye la capacidad fagocítica glial [48, 49, 143-145].

En este modelo, la microinyección de A β O en el cerebro de ratas, favoreció una considerable proliferación astrocítica y microglial, comparado con el grupo control, en los distintos tiempos evaluados. Respecto a la relación entre la activación glial y la neurotoxicidad, una diferencia muy marcada entre las ratas microinyectadas con A β O y SS, fue la presencia de astrocitos hipertróficos y células microgliales con morfología de una célula activada o ameboides que correlacionó con una extensa pérdida neuronal. El mayor número de células gliales activadas se observó a las 72 h, y correlaciona con una extensa degeneración en la región del GD, visualizada con FJB. Curiosamente, la proporción de astrocitos activos fue mayor que la proporción de microglia, aunque estas células mieloides aparecieron cerca de los espacios de pérdida neuronal. Varios estudios han sugerido que los astrocitos activos podrían contribuir a la producción y agregación de A β [101, 146]. Recientemente se ha sugerido que los astrocitos estimulados con A β O sufren un aumento de la expresión de BACE1 y ApoE [49]. Este estudio temporal de la respuesta celular sugiere que A β O directamente, o por medio de la activación glial, favorece la gradual pérdida neuronal por lo menos desde las 18h hasta los 7 días posterior a la microinyección. Sin embargo, la densidad neuronal del GD, aparentemente comienza a recuperarse en el grupo de ratas tratadas con A β O al día 30, si las comparamos con las ratas sacrificadas en intervalos previos. Pese a esto, la densidad neuronal al día

30 en ratas microinyectadas con A β O sigue siendo menor cuando se compara con el grupo de ratas control. Como mencionamos previamente, esto indica que A β O es capaz de ejercer la muerte neuronal de forma crónica la cual puede ser favorecida por un número moderado de astrocitos y microglia con morfología ameboide, que es una forma activa de la microglia.

Otro hallazgo que merece la pena comentar fue el fenómeno de recuperación neuronal, que pensamos que pudiera haber sido impulsado por los procesos de neurogénesis intrínsecos de la zona subgranular del GD. Por este motivo, sería interesante desarrollar investigaciones futuras en el que se describa el proceso de neurogénesis y los posibles efectos deletéreos asociados a la activación glial en nuestro modelo.

La estrecha relación entre las alteraciones neuronales y la presencia de células gliales activas fue confirmada con el análisis ultraestructural, en el que se detectaron anomalías principalmente en el grupo de ratas microinyectadas con A β O. A las 18h, las alteraciones del neuropilo y la reducción neuronal eran notorias, todo esto mantenía correlación con los datos sugestivos de neurodegeneración presentados previamente. Estas anormalidades eran más evidentes en los intervalos de 72h y 7 días, Algunos de los cambios que resaltaban el alto grado de neurodegeneración, eran reflejados en la aberrante morfología neuronal que se acompañaba de alteraciones citoplasmáticas y pérdida de organelos. Estos hallazgos, son de gran importancia ya que es el primer reporte que muestra los cambios ultraestructurales mediados por A β O de forma temporal.

Vale la pena mencionar que también se observó un alto grado de degeneración en las vainas de mielina axonales y “pérdida” (alteraciones) de las crestas y membranas mitocondriales internas lo que, sugiere degeneración axonal y disfunción mitocondrial. Ambos cambios favorecidos por la presencia de agregados de A β han sido previamente descritos [147, 148]. Cercano a los sitios de neurodegeneración y próximos a los espacios que representan pérdida neuronal, encontramos astrocitos hipertróficos, células microgliales activas con la presencia de vacuolas, mostrando una vez más, el papel que tienen estas células en las funciones benéficas, así como en funciones deletéreas, secundarias a la neurotoxicidad inducida por A β O.

Respecto a la presencia de algunas fibras tipo amiloide observadas únicamente a las 72h y 7 días en los grupos tratados con A β , valdría la pena realizar experimentos de inmunomicroscopía electrónica con la finalidad de evidenciar la posible presencia de A β intracelular. Por otro lado, no negamos la posibilidad de que parte de nuestra preparación de oligómeros podrían haber formado algún otro agregado estructural debido a las condiciones de temperatura y de pH en el tejido cerebral de ratas, y que estas “fibras de A β ”, pudieran estar contribuyendo a la neurotoxicidad. Sin embargo, estas fibras no fueron observadas a los 15 y 30 días posteriores a la cirugía, esto podría estar relacionado con el hecho de que identificamos células microgliales activas cercanas los sitios donde se encontraban las fibras. Esto podría hacernos pensar en la posibilidad, de que éstas hayan sido fagocitadas.

El fenómeno de “recuperación” observado a los 30 días en ratas tratadas con A β O, correlaciona con una disminución en la alteración observada en el citoplasma. Sin embargo, los A β O aparentemente continuaron ejerciendo efectos de neuro-tóxicos y promoviendo la inflamación, lo cual es evidente por la presencia de degeneración axonal, microglia con morfología ameboide, aunada a una evidente fagocitosis de organelos. Este hallazgo también se correlaciona con lo observado en microscopía confocal.

Teniendo en cuenta la presencia de activación glial, decidimos cuantificar los niveles de las citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-10, las cuales han sido descritas con funciones benéficas o perjudiciales relacionadas con la neurotoxicidad de los agregados A β [94, 97, 149]. En nuestro modelo, sólo realizamos una comparación entre las ratas microinyectadas con A β O y las ratas administradas con solución salina. De entrada, ambas ratas sufrieron una lesión mecánica que promovió la activación glial, aunque fue menor en el grupo de solución salina como se discutió anteriormente. Esto último podría explicar el hecho de que no observáramos cambios en los niveles de IL-10 e IL-1 β en ambos grupos en los tiempos agudos.

La respuesta inflamatoria tras una lesión en el SNC se caracteriza por un aumento de los niveles de citocinas y quimiocinas en los primeros minutos a horas después del evento, por parte de las células gliales o por las células epiteliales de la BHE, que sufre alteraciones por la lesión. Dichos eventos promueven el reclutamiento células inmunes periféricas al cerebro, entre 1 y 7 días posteriores a la

lesión [150]. A partir de estos días, como parte de los procesos de reparación celular y balance de la inflamación, algunas células gliales y monocitos perivasculares, comenzarán a producir mayores niveles de moléculas anti-inflamatorias y factores neurotróficos, que podrán promover la regeneración axonal, para reestablecer la homeostasis en la región de la lesión [151]. Por su parte, los oligómeros de A β estimulan a las células gliales a través de receptores de la inmunidad innata de manera rápida. Al igual que en el proceso de respuesta de inflamación por lesión, secretarán diferentes mediadores moleculares pro-inflamatorios y anti-inflamatorios. Sin embargo, mientras los agregados de A β se encuentren presentes, estimularán una respuesta pro-inflamatoria crónica que favorece la neurodegeneración [54], que no puede ser controlada debido a los diferentes mecanismos de toxicidad que ejercen los oligómeros y posibles alteraciones en la modulación de la inflamación.

Una de las deducciones respecto al incremento significativo de IL-1 β e IL-6 en el grupo de ratas tratadas con A β O y sacrificadas al día 30, es que estas citocinas, provenían del alto número de células microgliales activas. Estudios previos han señalado que IL-1 β puede inducir activación glial y daño neuronal [152]. No obstante, la sobreexpresión de IL-1 β puede también favorecer la eliminación de A β [149], y al mismo tiempo, puede contribuir a la fosforilación de tau [153]. Un efecto similar respecto a la eliminación de A β se ha observado con la IL-6, mediado por la gliosis [94] y aparentemente puede extender la pérdida neuronal inducida por la presencia de A β y la sobreestimulación de NMDAR [154]. Podría ser posible que la liberación de estas citocinas estuviera relacionada con el hecho de que en el día 30, no se identificaron fibras extracelulares tipo amiloide, como fueron observadas en los tiempos agudos. Sin embargo, esto no significa que el A β haya sido completamente eliminado del hipocampo y consideramos que esto es importante para estudios posteriores.

Por el contrario, IL-10 es una citocina que reduce la inflamación y la apoptosis. Por esta razón, se ha propuesto como un posible blanco terapéutico en varios trastornos del SNC, incluyendo la enfermedad de Alzheimer [95]. Sin embargo, la sobreexpresión de IL-10 en ratones transgénicos para APP o su eliminación en ratones APP/PS1, revelaron que los efectos antiinflamatorios de esta

citocina tendrían un impacto negativo, al reducir la eliminación de A β por las células microgliales, ya que la efectividad de este proceso es impulsado por un microambiente inflamatorio [97, 98]

En el presente estudio, el incremento en la producción de IL-10 observado al día 30, en el grupo de ratas tratadas con A β O, podría estar favoreciendo la recuperación de la densidad neuronal y aminorando así las alteraciones neuronales descritas previamente. A pesar del aumento de IL-10, los resultados de la microscopía electrónica confocal, mostraron que la capacidad fagocítica de la microglia no disminuyó, lo que puede deberse a los altos niveles de IL-1 β e IL-6. Estos datos podrían sugerirnos que establecer un equilibrio entre un perfil inflamatorio y anti-inflamatorio, podría ser la opción más viable de una estrategia terapéutica exitosa para tratar la amiloidosis en la EA, en lugar de favorecer alguno de estos perfiles.

IL-1 e IL-6 son citocinas proinflamatorias; sin embargo, el papel de ambas en el proceso inflamatorio puede ser diferente. Se sabe que IL-6 es una citocina pleiotrópica, en este sentido, estudios previamente reportados indican que la sobreexpresión de IL-6 en el SNC genera la presencia de gliosis reactiva que podría conducir a la neurodegeneración. Por otro lado, se sabe que la IL-10 tiene un papel fundamental en el control de la inflamación crónica y aguda. Estudios realizados en líquido cefalorraquídeo de pacientes con EA, han demostrado, que los niveles de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias se encuentran elevados [155]. Sin embargo, estos hallazgos no han logrado dilucidar si la presencia de A β se asocia con una respuesta de la inmunidad innata baja, lo que podría acelerar la cascada de eventos patológicos, o si la neuroinflamación representa un mecanismo de rescate que intenta eliminar la acumulación de agregados de amiloide tóxicos, a través de la activación de células gliales. Esta alteración de la respuesta inmune evitaría la eliminación de los agregados del péptido A β y conduciría a una producción alterada de citocinas, que favorecen el proceso neurodegenerativo. Además, la presencia de moléculas pro y anti-inflamatorias, sería el resultado de un cambio en el perfil de citocinas muy relacionado, con la fisiopatología de la enfermedad y en el caso particular de este modelo, con la presencia de agregados de A β O.

Un dato sorprendente de nuestros resultados fue la disminución en los niveles de IL-6, desde las 18h hasta el día 7, en el grupo de ratas tratadas con A β O. En este sentido, no podemos asegurar que

los niveles de IL-6 hayan sufrido una disminución total, ya que no medimos los niveles basales de esta interleucina en el hipocampo de ratas sin cirugía. A este respecto, se ha documentado que una desventaja de la cuantificación de citocinas por ELISA es la posible subestimación de la producción de éstas debido al alto consumo celular [156]. Por esta razón, nuestro siguiente objetivo, fue contrastar estos resultados con los niveles de expresión relativa del RNAm de IL-6. Los resultados obtenidos, nos muestran altos niveles de RNAm en el grupo de ratas administradas con A β O cuando se comparan con el grupo de control.

En relación a los niveles de mensajero alto y citocina bajos, se ha documentado la posible subestimación de la producción de citocinas debido al consumo celular en la cuantificación de citocinas por ELISA [156], lo que podría involucrar procesos de unión de citocinas a su receptor o degradación de proteínas. Algunos mediadores moleculares (IL-6, IL-1 β , TNF α , entre otros) presentan dos tipos de receptores: uno transmembranal, que activa la vía de señalización clásica y el receptor soluble, que induce la señalización trans. Si la citocina se encuentra unida a su receptor soluble, esta fracción de citocinas no podría ser detectada y cuantificada con una medición basada en inmunoensayos [157].

Después de analizar estos resultados aparentemente contradictorios y considerar sus posibles explicaciones, planeamos identificar la expresión STAT3, un factor de la transcripción clave en la vía de señalización de IL-6. Un reporte anterior de microinyección de A β en ratones demostró que el Amiloide es capaz de inducir la activación de STAT3 a través de la fosforilación (p-Tyr STAT3), lo que conduce a la apoptosis neuronal [120].

Con respecto al presente modelo, nosotros observamos la expresión de STAT3, principalmente en infiltrados celulares y células gliales. A las 18h, la expresión de STAT3 aumentó tanto en el grupo control, como en el grupo de ratas tratadas con A β , en infiltrados celulares y oligodendrocitos; probablemente como parte de la respuesta inflamatoria, ocasionada por el daño mecánico de la cirugía, que pudiera promover el daño de la BHE. Aunque pudiera parecer que el incremento en la expresión de STAT3 es igual en ambos grupos (SS y A β), podemos notar que los A β O promueven un ligero aumento en la expresión de esta molécula. Otra diferencia fue la localización nuclear de

STAT3. A pesar de que sólo identificamos la presencia de la STAT3 total, y no de formas fosforiladas, la acumulación nuclear de STAT3 es una señal de activación [122, 158].

Setenta y dos horas después de la microinyección de A β O, cuando la neurodegeneración y la activación glial aumentan (como discutimos anteriormente), se observó una moderada sobreexpresión STAT3 por células con morfología glial. Es importante señalar que dicha expresión se localizó en el núcleo, lo que podría sugerir la activación de dicha molécula. De la misma manera al día 7, la neurodegeneración persistió al igual que la activación glial en ratas tratadas con A β O. En este tiempo, la expresión de STAT3 no sólo aumentó, sino que también se observó en células con morfología activada y algunas de ellas presentaron una expresión nuclear. Por el contrario, al día 7 en el grupo de control detectamos la expresión de STAT3 únicamente en el citoplasma de neuronas. La expresión diferencial en este último tiempo debería ser estudiada en el futuro, debido a su posible relevancia en la recuperación neuronal después de una lesión traumática. Asumiendo que esté presente la vía de trans-señalización de IL-6 en los tiempos previos, se justifica la alta expresión de STAT3 total en astrocitos, principalmente en el día 7 posterior a la administración de A β O. La expresión de STAT3 permaneció 15 días después de la cirugía y su expresión correlaciona con una alta activación glial y muerte neuronal. Por otro lado, la vía de señalización clásica de IL-6, podría inducir una respuesta antiinflamatoria y proinflamatoria por trans-señalización, esta vía ha sido recientemente estudiada por su implicación en trastornos neurodegenerativos, tal como la patología amiloidea en la EA [159, 160].

La expresión citoplásmica de STAT3 presente en las neuronas del grupo control, disminuye en el día 15. Sin embargo, en las ratas infiltradas con A β O, aún permanece un alto número de células gliales positivas al factor con morfología hipertrófica y tinción nuclear, lo cual nos sugiere que la activación de STAT3 en las células gliales permanece al día 15, en donde retomando los resultados previos, la pérdida neuronal persistía en las ratas microinyectadas con A β O.

Al analizar los resultados de la expresión incrementada de STAT3 en células gliales y la muerte neuronal de los tiempos previamente mencionados, nos sugiere una posible relación entre estas alteraciones, teniendo en común al proceso de inflamación.

STAT3 es un factor de transcripción activado por la estimulación de varios mediadores moleculares pro-inflamatorios (IL-1, TNF α , IL-6) y anti-inflamatorios (IL-10). En el SNC, se han reportado funciones que causan controversia acerca de STAT3; y que podrían deberse a una respuesta celular específica o al microambiente inflamatorio. Por ejemplo, se ha involucrado a STAT3 en la regeneración de axones [161]. Además, la activación de STAT3 podría modular la plasticidad sináptica a través de la inducción de NMDAR y la depresión a largo plazo [108]. La inflamación es un inductor importante en la activación del factor STAT3 derivado de la activación glial, que podría promover diferentes procesos neuropatológicos, como el deterioro de la neurogénesis y la apoptosis [162]. Con respecto a la apoptosis, la activación de STAT3 por citocinas proinflamatorias, promueve la liberación de citocromo C y la activación de caspasa [109]. En un modelo de epilepsia en ratas inducida con Ácido Kaínico, se sabe que STAT3 se activa después de los estados epilépticos y la activación de este factor se ha relacionado con un aumento de la producción de la citocina IL-1, la cual podría ligarse con la muerte neuronal. En contraste, la inhibición de STAT3 con el compuesto WP1066 reduce los niveles de IL-1, la expresión de Iba1 y la muerte neuronal [163]. En relación con los modelos animales de microinyección de A β , se ha investigado el papel de los agregados del péptido en la activación de STAT3 en neuronas, fenómeno que favorece la transcripción de genes ligados al daño oxidativo (como iNOS) y que podría ser responsable de inducir la apoptosis neuronal [120].

En nuestro modelo animal, se presentó una alta expresión de STAT3 en tiempos agudos a la microinyección, que correlaciona con la neurodegeneración observada en la tinción de FJB. Consideramos que el incremento gradual en la expresión STAT3 de las 18h al día 15, puede ser consecuencia de la astrogliosis [114] y la activación microglial [121], como ya ha sido sugerido. Además, la localización nuclear STAT3 podría estar estimulando diferentes genes diana, relacionados con la inflamación y la neurotoxicidad. La activación de STAT3 se había detectado previamente sólo en neuronas y relacionado con la apoptosis [120].

Para aclarar la función de la vía de señalización JAK2/STAT3, diseñamos un ensayo de inhibición en cultivo primario mixto de hipocampo de rata, en donde utilizamos un inhibidor específico de JAK2 (AG490) y otro de STAT3 (Stattic). Los cultivos se expusieron a una concentración citotóxica de A β O durante 72 h, tiempo en el cual observamos una alta neurodegeneración, en el modelo animal. En ambos ensayos pudimos observar que la inhibición baja-moderada de la vía JAK2/

STAT3 disminuye la activación glial, y que dicho cambio disminuye la muerte neuronal promovida por A β O. Sin embargo, cuando intentamos aumentar la concentración de los inhibidores de STAT3, los resultados mostraron una disminución en la supervivencia neuronal y de los astrocitos. Lo anterior sugiere que la vía JAK2/STAT3 juega un papel fundamental en la toxicidad del A β O, ya que promueve la reactividad de los astrocitos, los cuales podrían producir y liberar mediadores inflamatorios que pudieran conducir a las neuronas al proceso de neurodegeneración.

En este sentido, reportes previos de la literatura han demostrado la activación patológica de la vía JAK2/STAT3, en células gliales activadas por la presencia de agregados del péptido A β . La estimulación de la cinasa JAK2 en ratones transgénicos de AD (APP/PS1 o 3xtgAD), evidenció que la activación de STAT3 promueve la astrogliosis y la disfunción sináptica. Por el contrario, en otro estudio en el que utilizan ratones APP/PS1, al inhibir la vía JAK2/STAT3 específicamente en células astrocíticas, se logró controlar la activación de dichas células, disminuyendo el déficit sináptico presentado en dichos ratones y una reducción en la formación de depósitos de A β , no relacionada a con el incremento en la fagocitosis microglial [122]. En este mismo sentido, el desarrollo de un knockout condicional para el factor STAT3 en astrocitos de ratones transgénicos APP / PS1, favoreció al establecimiento de un perfil anti-inflamatorio, que podría mediar la eliminación de agregados de A β por las células microgliales y reducir el deterioro cognitivo presentado por dichos ratones [123]. Finalmente, un experimento reciente en cultivos primarios de astrocitos expuestos con A β O y tratados con Stattic (1 μ M), mostró que STAT3 es responsable del estado reactivo mantenido de los astrocitos, descartando que dichos cambios se deban a la activación de otras vías de señalización relacionadas con la inflamación, como ERK y NF-kB. Además, la administración oral de Stattic en ratones transgénicos de AD (5xFAD) redujo la activación de STAT3 en los astrocitos, lo que se correlacionó con una mejora en la función cognitiva de dichos roedores [164].

La inhibición de JAK / STAT3 es una estrategia prometedora para modular la reactividad glial y favorecer la supervivencia de las neuronas expuestas a los efectos tóxico de los agregados del péptido A β . No obstante, como se observa en nuestros ensayos, la inhibición alta o total de la vía JAK2 / STAT3, podría inducir la neurodegeneración debido al papel crucial de la vía en procesos como la proliferación celular, la regeneración axonal y la plasticidad sináptica. Por tanto, una

estrategia ideal para reducir los efectos inflamatorios y neurotóxicos de los agregados de A β , sería modular la vía sólo en los astrocitos, como se indica en los experimentos mencionados anteriormente [122, 123].

Para respaldar esta propuesta, nuestros resultados en el modelo animal al día 30 en ratas tratadas con A β O, mostraron una disminución de células gliales que expresan STAT3 en comparación con lo observado en el día 7; consolidando la teoría de que la expresión reducida de STAT3 es un evento que podría estar relacionado con la recuperación en la densidad de neuronas maduras, descrita anteriormente. Aunque identificamos que la expresión de STAT3 en ratas tratadas con A β O y sacrificadas en el día 30, es aún mayor que en el grupo control, la expresión incrementada de STAT3 podría ser inducida por los niveles aumentados de IL-6 e IL-10, dos citocinas que favorecen la presencia y activación de este factor [165]. Sin embargo, no estamos seguros de si ambas citocinas a través de STAT3, podrían conducir a un aclaramiento del péptido de forma ineficiente, y que la alteración en este proceso podría continuar favoreciendo la muerte neuronal en nuestro modelo. Por esta razón, creemos que es importante llevar a cabo un seguimiento en la expresión STAT3, posterior a los 30 días de la microinyección de oligómeros, evaluados en este estudio. Otro aspecto que debe aclararse es la recuperación de la densidad neuronal observada, la cual podría verse favorecida por una reducción de los agregados de A β , posiblemente por la fagocitosis mediada por las células gliales. De ser así, sería interesante proponer en el modelo una segunda inyección de oligómeros a partir de los días 7 y 15, considerando los cambios que existen en la respuesta celular. Además, sería interesante describir la dinámica de la activación de STAT3 por IL-6 e IL-10, considerando que ambos aumentan en el día 30.

8. CONCLUSIONES

Partiendo de la importancia que tiene la inflamación en los pacientes con EA, en el modelo de microinyección de A β O en rata, se trató de identificar mediadores moleculares derivados de la activación glial, que pudieran mediar la neurodegeneración ligada a la presencia de A β O. Los resultados de nuestro estudio temporal sugieren que, los A β O median la neurotoxicidad indirecta a través de la activación de microglia y astrocitos. Una vía crucial en la inflamación mediada por A β O es JAK/STAT3 (activada principalmente en astrocitos y neuronas), responsable de favorecer la supervivencia celular, entre muchas otras funciones fisiológicas interesantes, que al mismo tiempo o en presencia de A β O podrían ejercer funciones pleiotrópicas. De acuerdo con nuestros resultados y reportes previos de la literatura, la estimulación de la vía en los astrocitos induce el estado de activación mediante el cual se puede establecer una respuesta rápida ante daños, factores químicos o agregados, como A β O. Sin embargo, los agregados de A β promueven una activación constante de la vía que conduce a un incremento en la presencia de astrocitos hipertróficos, que pueden promover un microambiente inflamatorio y un aumento de la neurodegeneración. Una terapia de inhibición de la vía JAK/STAT3, dirigida principalmente a regular la reactividad de los astrocitos, podría ser una estrategia excelente para disminuir la muerte neuronal favorecida por la inflamación, así como el deterioro cognitivo en la EA. Sin embargo, el uso de inhibidores de JAK/STAT3 debe considerarse con cautela, porque una dosis alta favorecería la muerte neuronal además de la ya generada por los agregados A β . Las citocinas que probablemente en el modelo animal podrían favorecer la expresión y activación de STAT3 son IL-6 e IL-10. Finalmente, consideramos que este modelo de microinyección podría ser útil para continuar describiendo moléculas o factores con función inmunomoduladora relacionada con los efectos neurotóxicos de A β O.

9. PERSPECTIVAS

A continuación, se definen algunas perspectivas de futuros estudios, considerando los resultados obtenidos:

1. Determinar si además del factor de transcripción STAT3, la microinyección de oligómeros de A β favorece la expresión del factor de transcripción STAT1 en las células gliales.
2. Evaluar la expresión de genes diana de STAT1, como el gen de la enzima β -secretasa y de la enzima Indoelamin-2,3-dioxigenasa (IDO).
3. Cuantificar el mediador molecular Interferón gamma.
4. Realizar estudios conductuales en modelo de microinyección en rata.
5. Implementar mediante un sistema de cánula a las ratas la microinyección de A β O y otros inhibidores.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Ferri, C.P., et al., *Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study*. Lancet, 2005. **366**(9503): p. 2112-7.
2. American Psychiatric Association, *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*. 2013.
3. Kalara, R.N., et al., *Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors*. Lancet Neurol, 2008. **7**(9): p. 812-26.
4. Gutierrez-Robledo, L.M. and I. Arrieta-Cruz, [*Dementia in Mexico: The need for a National Alzheimer's Plan*]. Gac Med Mex, 2015. **151**(5): p. 667-73.
5. McKhann, G., et al., *Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease*. Neurology, 1984. **34**(7): p. 939-44.
6. Serrano-Pozo, A., et al., *Neuropathological alterations in Alzheimer disease*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2011. **1**(1): p. a006189.
7. Perl, D.P., *Neuropathology of Alzheimer's disease*. Mt Sinai J Med, 2010. **77**(1): p. 32-42.
8. Bagad M., C.D., Khan Z., *Towards understanding Alzheimer's Disease: An Overview*. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 2013. **4**(4): p. 286-298.
9. Grundke-Iqbal, I., et al., *Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(13): p. 4913-7.
10. Arriagada, P.V., et al., *Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease*. Neurology, 1992. **42**(3 Pt 1): p. 631-9.
11. Sheng, J.G., R.E. Mrak, and W.S. Griffin, *Neuritic plaque evolution in Alzheimer's disease is accompanied by transition of activated microglia from primed to enlarged to phagocytic forms*. Acta Neuropathol, 1997. **94**(1): p. 1-5.
12. Rademakers, R., M. Cruts, and C. Van Broeckhoven, *Genetics of early-onset Alzheimer dementia*. ScientificWorldJournal, 2003. **3**: p. 497-519.
13. Bird, T.D., *Alzheimer Disease Overview*, in *GeneReviews((R))*, M.P. Adam, et al., Editors. 1993: Seattle (WA).
14. Reisberg, B., *Diagnostic criteria in dementia: a comparison of current criteria, research challenges, and implications for DSM-V*. J Geriatr Psychiatry Neurol, 2006. **19**(3): p. 137-46.
15. al, D.B.e., *Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria*. Lancet Neurology, 2007. **6**((8)): p. 734-746.
16. Boller, F. and G.D. Barba, *Neuropsychological tests in Alzheimer's disease*. Aging (Milano), 2001. **13**(3): p. 210-20.
17. Whitwell, J.L., et al., *Neuroimaging correlates of pathologically defined subtypes of Alzheimer's disease: a case-control study*. Lancet Neurol, 2012. **11**(10): p. 868-77.
18. Hardy, J.A. and G.A. Higgins, *Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis*. Science, 1992. **256**(5054): p. 184-5.
19. Spires, T.L. and A.J. Hannan, *Molecular mechanisms mediating pathological plasticity in Huntington's disease and Alzheimer's disease*. J Neurochem, 2007. **100**(4): p. 874-82.
20. Allinson, T.M., et al., *ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases*. J Neurosci Res, 2003. **74**(3): p. 342-52.

21. De Strooper, B. and W. Annaert, *Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein*. J Cell Sci, 2000. **113 (Pt 11)**: p. 1857-70.
22. Brothers, H.M., M.L. Gosztyla, and S.R. Robinson, *The Physiological Roles of Amyloid-beta Peptide Hint at New Ways to Treat Alzheimer's Disease*. Front Aging Neurosci, 2018. **10**: p. 118.
23. Meraz-Rios, M.A., et al., *Early onset Alzheimer's disease and oxidative stress*. Oxid Med Cell Longev, 2014. **2014**: p. 375968.
24. Sakono, M. and T. Zako, *Amyloid oligomers: formation and toxicity of Abeta oligomers*. FEBS J, 2010. **277(6)**: p. 1348-58.
25. Kulic, L., et al., *Early accumulation of intracellular fibrillar oligomers and late congophilic amyloid angiopathy in mice expressing the Osaka intra-Abeta APP mutation*. Transl Psychiatry, 2012. **2**: p. e183.
26. Finder, V.H. and R. Glockshuber, *Amyloid-beta aggregation*. Neurodegener Dis, 2007. **4(1)**: p. 13-27.
27. Miller, Y., B. Ma, and R. Nussinov, *Zinc ions promote Alzheimer Abeta aggregation via population shift of polymorphic states*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107(21)**: p. 9490-5.
28. Atwood, C.S., et al., *Dramatic aggregation of Alzheimer abeta by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis*. J Biol Chem, 1998. **273(21)**: p. 12817-26.
29. Khondker, A., R.J. Alsop, and M.C. Rheinstadter, *Membrane-Accelerated Amyloid-beta Aggregation and Formation of Cross-beta Sheets*. Membranes (Basel), 2017. **7(3)**.
30. Yamamoto, N., et al., *A ganglioside-induced toxic soluble Abeta assembly. Its enhanced formation from Abeta bearing the Arctic mutation*. J Biol Chem, 2007. **282(4)**: p. 2646-55.
31. De Simone, A. and P. Derreumaux, *Low molecular weight oligomers of amyloid peptides display beta-barrel conformations: a replica exchange molecular dynamics study in explicit solvent*. J Chem Phys, 2010. **132(16)**: p. 165103.
32. Yasumoto, T., et al., *High molecular weight amyloid beta1-42 oligomers induce neurotoxicity via plasma membrane damage*. FASEB J, 2019. **33(8)**: p. 9220-9234.
33. Kim, W. and M.H. Hecht, *Mutations enhance the aggregation propensity of the Alzheimer's A beta peptide*. J Mol Biol, 2008. **377(2)**: p. 565-74.
34. Westwood, M., Lawson A., *Opportunities for Conformation-Selective Antibodies in Amyloid-Related Diseases*. Antibodies, 2015. **4(3)**: p. 170-196.
35. Lee, C.Y. and G.E. Landreth, *The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain*. J Neural Transm, 2010. **117(8)**: p. 949-60.
36. Bates, K.A., et al., *Clearance mechanisms of Alzheimer's amyloid-beta peptide: implications for therapeutic design and diagnostic tests*. Mol Psychiatry, 2009. **14(5)**: p. 469-86.
37. Deane, R., et al, *Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease*. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2009. **8**: p. 16-30.
38. Saido, T. and M.A. Leissring, *Proteolytic degradation of amyloid beta-protein*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2(6)**: p. a006379.
39. Urbanc, B., et al., *Neurotoxic effects of thioflavin S-positive amyloid deposits in transgenic mice and Alzheimer's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99(22)**: p. 13990-5.

40. Knowles, R.B., T. Gomez-Isla, and B.T. Hyman, *Abeta associated neuropil changes: correlation with neuronal loss and dementia*. J Neuropathol Exp Neurol, 1998. **57**(12): p. 1122-30.
41. Sengupta, U., A.N. Nilson, and R. Kaye, *The Role of Amyloid-beta Oligomers in Toxicity, Propagation, and Immunotherapy*. EBioMedicine, 2016. **6**: p. 42-49.
42. Alberdi, E., et al., *Amyloid beta oligomers induce Ca²⁺ dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors*. Cell Calcium, 2010. **47**(3): p. 264-72.
43. Serra-Batiste, M., et al., *Abeta42 assembles into specific beta-barrel pore-forming oligomers in membrane-mimicking environments*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(39): p. 10866-71.
44. Chafekar, S.M., F. Baas, and W. Scheper, *Oligomer-specific Abeta toxicity in cell models is mediated by selective uptake*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1782**(9): p. 523-31.
45. Umeda, T., et al., *Intracellular amyloid beta oligomers impair organelle transport and induce dendritic spine loss in primary neurons*. Acta Neuropathol Commun, 2015. **3**: p. 51.
46. Lai, A.Y. and J. McLaurin, *Mechanisms of amyloid-Beta Peptide uptake by neurons: the role of lipid rafts and lipid raft-associated proteins*. Int J Alzheimers Dis, 2010. **2011**: p. 548380.
47. Pagani, L. and A. Eckert, *Amyloid-Beta interaction with mitochondria*. Int J Alzheimers Dis, 2011. **2011**: p. 925050.
48. Maezawa, I., et al., *Amyloid-beta protein oligomer at low nanomolar concentrations activates microglia and induces microglial neurotoxicity*. J Biol Chem, 2011. **286**(5): p. 3693-706.
49. Wang, W., et al., *Toxic amyloid-beta oligomers induced self-replication in astrocytes triggering neuronal injury*. EBioMedicine, 2019. **42**: p. 174-187.
50. Blum-Degen, D., et al., *Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients*. Neurosci Lett, 1995. **202**(1-2): p. 17-20.
51. Remarque, E.J., et al., *Patients with Alzheimer's disease display a pro-inflammatory phenotype*. Exp Gerontol, 2001. **36**(1): p. 171-6.
52. Walker, D.G. and L.F. Lue, *Investigations with cultured human microglia on pathogenic mechanisms of Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases*. J Neurosci Res, 2005. **81**(3): p. 412-25.
53. Sedgwick, J.D., et al., *Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(16): p. 7438-42.
54. Salminen, A., et al., *Inflammation in Alzheimer's disease: amyloid-beta oligomers trigger innate immunity defence via pattern recognition receptors*. Prog Neurobiol, 2009. **87**(3): p. 181-94.
55. Gehrman, J., Y. Matsumoto, and G.W. Kreutzberg, *Microglia: intrinsic immunoeffector cell of the brain*. Brain Res Brain Res Rev, 1995. **20**(3): p. 269-87.
56. Majumdar, A., et al., *Activation of microglia acidifies lysosomes and leads to degradation of Alzheimer amyloid fibrils*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(4): p. 1490-6.
57. Wegiel, J., et al., *The role of microglial cells and astrocytes in fibrillar plaque evolution in transgenic APP(SW) mice*. Neurobiol Aging, 2001. **22**(1): p. 49-61.

58. Basak, J.M., et al., *Low-density lipoprotein receptor represents an apolipoprotein E-independent pathway of Aβ uptake and degradation by astrocytes*. J Biol Chem, 2012. **287**(17): p. 13959-71.
59. Askarova, S., et al., *Role of Aβ-receptor for advanced glycation endproducts interaction in oxidative stress and cytosolic phospholipase A(2) activation in astrocytes and cerebral endothelial cells*. Neuroscience, 2011. **199**: p. 375-85.
60. Jana, A. and K. Pahan, *Fibrillar amyloid-beta-activated human astroglia kill primary human neurons via neutral sphingomyelinase: implications for Alzheimer's disease*. J Neurosci, 2010. **30**(38): p. 12676-89.
61. Kimura, N., et al., *Amyloid beta up-regulates brain-derived neurotrophic factor production from astrocytes: rescue from amyloid beta-related neuritic degeneration*. J Neurosci Res, 2006. **84**(4): p. 782-9.
62. Minghetti, L., *Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases*. J Neuropathol Exp Neurol, 2004. **63**(9): p. 901-10.
63. Wyss-Coray, T., *Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response?* Nat Med, 2006. **12**(9): p. 1005-15.
64. Jiang, H., et al., *Elevated CSF levels of TACE activity and soluble TNF receptors in subjects with mild cognitive impairment and patients with Alzheimer's disease*. Mol Neurodegener, 2011. **6**: p. 69.
65. Tarkowski, E., et al., *Increased intrathecal levels of the angiogenic factors VEGF and TGF-beta in Alzheimer's disease and vascular dementia*. Neurobiol Aging, 2002. **23**(2): p. 237-43.
66. Mrak, R.E. and W.S. Griffin, *Potential inflammatory biomarkers in Alzheimer's disease*. J Alzheimers Dis, 2005. **8**(4): p. 369-75.
67. Meda, L., et al., *Proinflammatory profile of cytokine production by human monocytes and murine microglia stimulated with beta-amyloid[25-35]*. J Neuroimmunol, 1999. **93**(1-2): p. 45-52.
68. Patel, N.S., et al., *Inflammatory cytokine levels correlate with amyloid load in transgenic mouse models of Alzheimer's disease*. J Neuroinflammation, 2005. **2**(1): p. 9.
69. Kamata, H., et al., *Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases*. Cell, 2005. **120**(5): p. 649-61.
70. Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich, *Tumor necrosis factor signaling*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 45-65.
71. Takeuchi, H., et al., *Tumor necrosis factor-alpha induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner*. J Biol Chem, 2006. **281**(30): p. 21362-8.
72. Blasko, I., et al., *Costimulatory effects of interferon-gamma and interleukin-1beta or tumor necrosis factor alpha on the synthesis of Aβ1-40 and Aβ1-42 by human astrocytes*. Neurobiol Dis, 2000. **7**(6 Pt B): p. 682-9.
73. Liao, Y.F., et al., *Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interferon-gamma stimulate gamma-secretase-mediated cleavage of amyloid precursor protein through a JNK-dependent MAPK pathway*. J Biol Chem, 2004. **279**(47): p. 49523-32.
74. McAlpine, F.E., et al., *Inhibition of soluble TNF signaling in a mouse model of Alzheimer's disease prevents pre-plaque amyloid-associated neuropathology*. Neurobiol Dis, 2009. **34**(1): p. 163-77.

75. Montgomery, S.L., et al., *Ablation of TNF-RI/RII expression in Alzheimer's disease mice leads to an unexpected enhancement of pathology: implications for chronic pan-TNF-alpha suppressive therapeutic strategies in the brain.* Am J Pathol, 2011. **179**(4): p. 2053-70.
76. Williams, T.J., *The role of prostaglandins in inflammation.* Ann R Coll Surg Engl, 1978. **60**(3): p. 198-201.
77. Yermakova, A.V., et al., *Cyclooxygenase-1 in human Alzheimer and control brain: quantitative analysis of expression by microglia and CA3 hippocampal neurons.* J Neuropathol Exp Neurol, 1999. **58**(11): p. 1135-46.
78. Ho, L., et al., *Neuronal cyclooxygenase 2 expression in the hippocampal formation as a function of the clinical progression of Alzheimer disease.* Arch Neurol, 2001. **58**(3): p. 487-92.
79. Xiang, Z., et al., *Cyclooxygenase (COX)-2 and cell cycle activity in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease neuropathology.* Neurobiol Aging, 2002. **23**(3): p. 327-34.
80. Xiang, Z., et al., *Cyclooxygenase-2 promotes amyloid plaque deposition in a mouse model of Alzheimer's disease neuropathology.* Gene Expr, 2002. **10**(5-6): p. 271-8.
81. Choi, S.H. and F. Bosetti, *Cyclooxygenase-1 null mice show reduced neuroinflammation in response to beta-amyloid.* Aging (Albany NY), 2009. **1**(2): p. 234-44.
82. Hoozemans, J.J., et al., *Interleukin-1beta induced cyclooxygenase 2 expression and prostaglandin E2 secretion by human neuroblastoma cells: implications for Alzheimer's disease.* Exp Gerontol, 2001. **36**(3): p. 559-70.
83. Goldgaber, D., et al., *Interleukin 1 regulates synthesis of amyloid beta-protein precursor mRNA in human endothelial cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(19): p. 7606-10.
84. Griffin, W.S., et al., *Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(19): p. 7611-5.
85. Griffin, W.S., et al., *Interleukin-1 expression in different plaque types in Alzheimer's disease: significance in plaque evolution.* J Neuropathol Exp Neurol, 1995. **54**(2): p. 276-81.
86. Li, Y., et al., *S100 beta increases levels of beta-amyloid precursor protein and its encoding mRNA in rat neuronal cultures.* J Neurochem, 1998. **71**(4): p. 1421-8.
87. Sheng, J.G., et al., *Interleukin-1 promotes expression and phosphorylation of neurofilament and tau proteins in vivo.* Exp Neurol, 2000. **163**(2): p. 388-91.
88. Li, Y., et al., *Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway.* J Neurosci, 2003. **23**(5): p. 1605-11.
89. Kitazawa, M., et al., *Blocking IL-1 signaling rescues cognition, attenuates tau pathology, and restores neuronal beta-catenin pathway function in an Alzheimer's disease model.* J Immunol, 2011. **187**(12): p. 6539-49.
90. Matousek, S.B., et al., *Chronic IL-1beta-mediated neuroinflammation mitigates amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease without inducing overt neurodegeneration.* J Neuroimmune Pharmacol, 2012. **7**(1): p. 156-64.
91. Hull, M., et al., *Occurrence of interleukin-6 in cortical plaques of Alzheimer's disease patients may precede transformation of diffuse into neuritic plaques.* Ann N Y Acad Sci, 1996. **777**: p. 205-12.

92. Ringheim, G.E., et al., *Enhancement of beta-amyloid precursor protein transcription and expression by the soluble interleukin-6 receptor/interleukin-6 complex*. Brain Res Mol Brain Res, 1998. **55**(1): p. 35-44.
93. Quintanilla, R.A., et al., *Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway*. Exp Cell Res, 2004. **295**(1): p. 245-57.
94. Chakrabarty, P., et al., *Massive gliosis induced by interleukin-6 suppresses Abeta deposition in vivo: evidence against inflammation as a driving force for amyloid deposition*. FASEB J, 2010. **24**(2): p. 548-59.
95. Lobo-Silva, D., et al., *Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation*. J Neuroinflammation, 2016. **13**(1): p. 297.
96. Szczepanik, A.M., et al., *IL-4, IL-10 and IL-13 modulate A beta(1--42)-induced cytokine and chemokine production in primary murine microglia and a human monocyte cell line*. J Neuroimmunol, 2001. **113**(1): p. 49-62.
97. Chakrabarty, P., et al., *IL-10 alters immunoproteostasis in APP mice, increasing plaque burden and worsening cognitive behavior*. Neuron, 2015. **85**(3): p. 519-33.
98. Guillot-Sestier, M.V., et al., *Il10 deficiency rebalances innate immunity to mitigate Alzheimer-like pathology*. Neuron, 2015. **85**(3): p. 534-48.
99. Kinney, J.W., et al., *Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease*. Alzheimers Dement (N Y), 2018. **4**: p. 575-590.
100. Decourt, B., D.K. Lahiri, and M.N. Sabbagh, *Targeting Tumor Necrosis Factor Alpha for Alzheimer's Disease*. Curr Alzheimer Res, 2017. **14**(4): p. 412-425.
101. Cho, H.J., et al., *IFN-gamma-induced BACE1 expression is mediated by activation of JAK2 and ERK1/2 signaling pathways and direct binding of STAT1 to BACE1 promoter in astrocytes*. Glia, 2007. **55**(3): p. 253-62.
102. Orellana, D.I., et al., *Role of the JAKs/STATs pathway in the intracellular calcium changes induced by interleukin-6 in hippocampal neurons*. Neurotox Res, 2005. **8**(3-4): p. 295-304.
103. Ben Haim, L., et al., *The JAK/STAT3 pathway is a common inducer of astrocyte reactivity in Alzheimer's and Huntington's diseases*. J Neurosci, 2015. **35**(6): p. 2817-29.
104. Nicolas, C.S., et al., *The role of JAK-STAT signaling within the CNS*. JAKSTAT, 2013. **2**(1): p. e22925.
105. Nabavi, S.M., et al., *Targeting STATs in neuroinflammation: The road less traveled!* Pharmacol Res, 2019. **141**: p. 73-84.
106. James M. Murphy, G.M.T., Douglas J. Hilton, Christopher J. Greenhalgh,, *Chapter 64 - The Negative Regulation of JAK/STAT Signaling*. Handbook of Cell Signaling (Second Edition). 2010: Academic Press.
107. Bonni, A., et al., *Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway*. Science, 1997. **278**(5337): p. 477-83.
108. Nicolas, C.S., et al., *The Jak/STAT pathway is involved in synaptic plasticity*. Neuron, 2012. **73**(2): p. 374-90.
109. Dedoni, S., M.C. Olianias, and P. Onali, *Interferon-beta induces apoptosis in human SH-SY5Y neuroblastoma cells through activation of JAK-STAT signaling and down-regulation of PI3K/Akt pathway*. J Neurochem, 2010. **115**(6): p. 1421-33.
110. Yadav, A., et al., *JAK/STAT3 pathway is involved in survival of neurons in response to insulin-like growth factor and negatively regulated by suppressor of cytokine signaling-3*. J Biol Chem, 2005. **280**(36): p. 31830-40.

111. Ebner, F.H., et al., *Use of STAT1 inhibitors in the treatment of brain I/R injury and neurodegenerative diseases*. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, 2011. **11**(1): p. 2-7.
112. Herrmann, J.E., et al., *STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury*. *J Neurosci*, 2008. **28**(28): p. 7231-43.
113. Ceyzeriat, K., et al., *The complex STATes of astrocyte reactivity: How are they controlled by the JAK-STAT3 pathway?* *Neuroscience*, 2016. **330**: p. 205-18.
114. O'Callaghan, J.P., et al., *Early activation of STAT3 regulates reactive astrogliosis induced by diverse forms of neurotoxicity*. *PLoS One*, 2014. **9**(7): p. e102003.
115. Wu, Y., et al., *Study on the mechanism of JAK2/STAT3 signaling pathway-mediated inflammatory reaction after cerebral ischemia*. *Mol Med Rep*, 2018. **17**(4): p. 5007-5012.
116. Chen, X.M., et al., *Effect of the JAK2/STAT3 signaling pathway on nerve cell apoptosis in rats with white matter injury*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019. **23**(1): p. 321-327.
117. Wang, T., et al., *The role of the JAK-STAT pathway in neural stem cells, neural progenitor cells and reactive astrocytes after spinal cord injury*. *Biomed Rep*, 2015. **3**(2): p. 141-146.
118. Park, K.W., S.E. Nozell, and E.N. Benveniste, *Protective role of STAT3 in NMDA and glutamate-induced neuronal death: negative regulatory effect of SOCS3*. *PLoS One*, 2012. **7**(11): p. e50874.
119. Chiba, T., et al., *Amyloid-beta causes memory impairment by disturbing the JAK2/STAT3 axis in hippocampal neurons*. *Mol Psychiatry*, 2009. **14**(2): p. 206-22.
120. Wan, J., et al., *Tyk2/STAT3 signaling mediates beta-amyloid-induced neuronal cell death: implications in Alzheimer's disease*. *J Neurosci*, 2010. **30**(20): p. 6873-81.
121. Eufemi, M., et al., *Acetylation and phosphorylation of STAT3 are involved in the responsiveness of microglia to beta amyloid*. *Neurochem Int*, 2015. **81**: p. 48-56.
122. Ceyzeriat, K., et al., *Modulation of astrocyte reactivity improves functional deficits in mouse models of Alzheimer's disease*. *Acta Neuropathol Commun*, 2018. **6**(1): p. 104.
123. Reichenbach, N., et al., *Inhibition of Stat3-mediated astrogliosis ameliorates pathology in an Alzheimer's disease model*. *EMBO Mol Med*, 2019. **11**(2).
124. Choi, M., et al., *Inhibition of STAT3 phosphorylation attenuates impairments in learning and memory in 5XFAD mice, an animal model of Alzheimer's disease*. *J Pharmacol Sci*, 2020. **143**(4): p. 290-299.
125. Klein, W.L., *Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets*. *Neurochem Int*, 2002. **41**(5): p. 345-52.
126. Paxinos, G. and C. Watson, *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 4th ed. 1998, San Diego: Academic Press.
127. Osorio, B., et al., *Cocultures of GFP(+) -granule cells with GFP(-) -pyramidal cells and interneurons for the study of mossy fiber neurotransmission with paired recordings*. *Hippocampus*, 2013. **23**(4): p. 247-52.
128. Miyamoto, N., et al., *The JAK2 inhibitor AG490 predominantly abrogates the growth of human B-precursor leukemic cells with 11q23 translocation or Philadelphia chromosome*. *Leukemia*, 2001. **15**(11): p. 1758-68.
129. Schust, J., et al., *Stattic: a small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization*. *Chem Biol*, 2006. **13**(11): p. 1235-42.
130. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. *Nat Methods*, 2012. **9**(7): p. 676-82.

131. Nichols, M.R., et al., *Biophysical comparison of soluble amyloid-beta(1-42) protofibrils, oligomers, and protofilaments*. *Biochemistry*, 2015. **54**(13): p. 2193-204.
132. Fandrich, M., *Oligomeric intermediates in amyloid formation: structure determination and mechanisms of toxicity*. *J Mol Biol*, 2012. **421**(4-5): p. 427-40.
133. Kasza, A., et al., *Studies for Improving a Rat Model of Alzheimer's Disease: Icv Administration of Well-Characterized beta-Amyloid 1-42 Oligomers Induce Dysfunction in Spatial Memory*. *Molecules*, 2017. **22**(11).
134. Zhang, L., et al., *7.0T nuclear magnetic resonance evaluation of the amyloid beta (1-40) animal model of Alzheimer's disease: comparison of cytology verification*. *Neural Regen Res*, 2014. **9**(4): p. 430-5.
135. Karthick, C., et al., *Time-dependent effect of oligomeric amyloid-beta (1-42)-induced hippocampal neurodegeneration in rat model of Alzheimer's disease*. *Neurol Res*, 2019. **41**(2): p. 139-150.
136. Perez, J.L., et al., *Soluble oligomeric forms of beta-amyloid (Abeta) peptide stimulate Abeta production via astrogliosis in the rat brain*. *Exp Neurol*, 2010. **223**(2): p. 410-21.
137. Forny-Germano, L., et al., *Alzheimer's disease-like pathology induced by amyloid-beta oligomers in nonhuman primates*. *J Neurosci*, 2014. **34**(41): p. 13629-43.
138. Carrero, I., et al., *Oligomers of beta-amyloid protein (Abeta1-42) induce the activation of cyclooxygenase-2 in astrocytes via an interaction with interleukin-1beta, tumour necrosis factor-alpha, and a nuclear factor kappa-B mechanism in the rat brain*. *Exp Neurol*, 2012. **236**(2): p. 215-27.
139. Gonzalo-Ruiz, A., et al., *A rat model of oligomeric forms of beta-amyloid (A β 1) peptide: neuronal loss, synaptic alteration, astrogliosis, and calcium-binding proteins activation in vivo*. *Eur. J. Anat.*, 2011. **15**: p. 47-72.
140. DaRocha-Souto, B., et al., *Brain oligomeric beta-amyloid but not total amyloid plaque burden correlates with neuronal loss and astrocyte inflammatory response in amyloid precursor protein/tau transgenic mice*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2011. **70**(5): p. 360-76.
141. Faucher, P., et al., *Hippocampal Injections of Oligomeric Amyloid beta-peptide (1-42) Induce Selective Working Memory Deficits and Long-lasting Alterations of ERK Signaling Pathway*. *Front Aging Neurosci*, 2015. **7**: p. 245.
142. Komleva, Y.K., et al., *[Early changes in hippocampal neurogenesis induced by soluble Ab1-42 oligomers]*. *Biomed Khim*, 2018. **64**(4): p. 326-333.
143. Sondag, C.M., G. Dhawan, and C.K. Combs, *Beta amyloid oligomers and fibrils stimulate differential activation of primary microglia*. *J Neuroinflammation*, 2009. **6**: p. 1.
144. Minter, M.R., J.M. Taylor, and P.J. Crack, *The contribution of neuroinflammation to amyloid toxicity in Alzheimer's disease*. *J Neurochem*, 2016. **136**(3): p. 457-74.
145. Pan, X.D., et al., *Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid is attenuated by oligomeric beta-amyloid: implications for Alzheimer's disease*. *Mol Neurodegener*, 2011. **6**: p. 45.
146. Zhao, J., T. O'Connor, and R. Vassar, *The contribution of activated astrocytes to Abeta production: implications for Alzheimer's disease pathogenesis*. *J Neuroinflammation*, 2011. **8**: p. 150.
147. Arrazola, M.S., et al., *Wnt Signaling Prevents the Abeta Oligomer-Induced Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening Preserving Mitochondrial Structure in Hippocampal Neurons*. *PLoS One*, 2017. **12**(1): p. e0168840.

148. Kim, M.J.H., Y. H.; Choi, K. J., Jun, S.; Je A. R.; Chae H.; Lee C.; Kweon H. S., *Ultrastructural Abnormalities in APP/PSEN1 Transgenic Mouse Brain as the Alzheimer's Disease Model*. Applied Microscopy, 2012. **42**(4): p. 179-85.
149. Shaftel, S.S., et al., *Sustained hippocampal IL-1 beta overexpression mediates chronic neuroinflammation and ameliorates Alzheimer plaque pathology*. J Clin Invest, 2007. **117**(6): p. 1595-604.
150. Ramos-Cejudo, J., et al., *Traumatic Brain Injury and Alzheimer's Disease: The Cerebrovascular Link*. EBioMedicine, 2018. **28**: p. 21-30.
151. Mietto, B.S., K. Mostacada, and A.M. Martinez, *Neurotrauma and inflammation: CNS and PNS responses*. Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 251204.
152. Craft, J.M., et al., *Interleukin 1 receptor antagonist knockout mice show enhanced microglial activation and neuronal damage induced by intracerebroventricular infusion of human beta-amyloid*. J Neuroinflammation, 2005. **2**: p. 15.
153. Ghosh, S., et al., *Sustained interleukin-1beta overexpression exacerbates tau pathology despite reduced amyloid burden in an Alzheimer's mouse model*. J Neurosci, 2013. **33**(11): p. 5053-64.
154. Qiu, Z. and D.L. Gruol, *Interleukin-6, beta-amyloid peptide and NMDA interactions in rat cortical neurons*. J Neuroimmunol, 2003. **139**(1-2): p. 51-7.
155. Taipa, R., et al., *Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in the CSF of patients with Alzheimer's disease and their correlation with cognitive decline*. Neurobiol Aging, 2019. **76**: p. 125-132.
156. Amsen, D., K.E. de Visser, and T. Town, *Approaches to determine expression of inflammatory cytokines*. Methods Mol Biol, 2009. **511**: p. 107-42.
157. Stenken, J.A. and A.J. Poschenrieder, *Bioanalytical chemistry of cytokines--a review*. Anal Chim Acta, 2015. **853**: p. 95-115.
158. Mertens, C. and J.E. Darnell, Jr., *SnapShot: JAK-STAT signaling*. Cell, 2007. **131**(3): p. 612.
159. Rothaug, M., C. Becker-Pauly, and S. Rose-John, *The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1863**(6 Pt A): p. 1218-27.
160. Escrig, A., et al., *IL-6 trans-signaling in the brain influences the behavioral and physiopathological phenotype of the Tg2576 and 3xTgAD mouse models of Alzheimer's disease*. Brain Behav Immun, 2019.
161. Mehta, S.T., et al., *Hyperactivated Stat3 boosts axon regeneration in the CNS*. Exp Neurol, 2016. **280**: p. 115-20.
162. Chen, E., et al., *A novel role of the STAT3 pathway in brain inflammation-induced human neural progenitor cell differentiation*. Curr Mol Med, 2013. **13**(9): p. 1474-84.
163. Tian, D.S., et al., *Chemokine CCL2-CCR2 Signaling Induces Neuronal Cell Death via STAT3 Activation and IL-1beta Production after Status Epilepticus*. J Neurosci, 2017. **37**(33): p. 7878-7892.
164. Choi, M., et al., *Inhibition of STAT3 phosphorylation attenuates impairments in learning and memory in 5XFAD mice, an animal model of Alzheimer's disease*. J Pharmacol Sci, 2020.
165. Niemand, C., et al., *Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3*. J Immunol, 2003. **170**(6): p. 3263-72.

11. ANEXOS

Anexo I. Artículo original publicado derivado del proyecto de Doctorado



International Journal of
Molecular Sciences



Article

Activation of STAT3 Regulates Reactive Astrogliosis and Neuronal Death Induced by A β O Neurotoxicity

Danira Toral-Rios ¹, Genaro Patiño-López ², Gisela Gómez-Lira ³, Rafael Gutiérrez ³,
Fernando Becerril-Pérez ⁴, Aldebarán Rosales-Córdova ⁵, Juan Carlos León-Contreras ⁶,
Rogelio Hernández-Pando ⁶, Ismael León-Rivera ⁷, Isabel Soto-Cruz ⁸,
Benjamín Florán-Garduño ¹ and Victoria Campos-Peña ^{9,*}

- ¹ Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México 07360, Mexico; dtoral@fisio.cinvestav.mx (D.T.-R.); bfloran@fisio.cinvestav.mx (B.F.-G.)
- ² Laboratorio de Investigación en Inmunología y Proteómica, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México 06720, Mexico; gena23pat@yahoo.com
- ³ Departamento de Farmacobiología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México 14330, Mexico; glira@cinvestav.mx (G.G.-L.); rafagut@cinvestav.mx (R.G.)
- ⁴ Research Institute of Molecular Pathology (IMP), Vienna Biocenter (VBC), Campus-Vienna-BioCenter 1, 1030 Vienna, Austria; fernando.becerril@imp.ac.at
- ⁵ Departamento de Administración, Facultad de Economía y Negocios, Universidad Anáhuac de México, Huixquilucan 52786, Mexico; carlos.rosalesc@anahuac.mx
- ⁶ Departamento de Patología, Sección Patología Experimental, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán, Ciudad de México 14080, Mexico; jcleonc@hotmail.com (J.C.L.-C.); rhdezpando@hotmail.com (R.H.-P.)
- ⁷ Centro de Investigaciones Químicas, IICBA, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca Morelos 62210, Mexico; ismaelr@uaem.mx
- ⁸ Laboratorio de Oncología Molecular, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 09230, Mexico; sotocruz@unam.mx
- ⁹ Laboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, Ciudad de México 14269, Mexico
- * Correspondence: neurovcp@ymail.com; Tel.: +555-6063-822 (ext. 2010)

Received: 27 August 2020; Accepted: 25 September 2020; Published: 10 October 2020



Abstract: Amyloid-beta oligomers (A β O) have been proposed as the most potent neurotoxic and inflammation inducers in Alzheimer's disease (AD). A β O contribute to AD pathogenesis by impairing the production of several cytokines and inflammation-related signaling pathways, such as the Janus kinases/signal transducer of transcription factor-3 (JAK/STAT3) pathway. STAT3 modulates glial activation, indirectly regulates A β deposition, and induces cognitive decline in AD transgenic models. However, in vivo studies using an A β O microinjection rat model have not yet explored STAT3 role. The main purpose of this study was to elucidate if a single microinjection of A β O could promote an increased expression of STAT3 in glial cells favoring neuroinflammation and neurodegeneration. We designed a model of intrahippocampal microinjection and assessed glial activation, cytokines production, STAT3 expression, and neurodegeneration in time. Our results showed robust expression of STAT3 in glial cells (mainly in astrocytes) and neurons, correlating with neuronal death in response to A β O administration. A STAT3 inhibition assay conducted in rat primary hippocampal cultures, suggested that the induction of the transcription factor by A β O in astrocytes leads them to an activation state that may favor neuronal death. Notwithstanding, pharmacological inhibition of the JAK2/STAT3 pathway should be focused on astrocytes because it is also essential in neurons survival. Overall, these findings strongly suggest the participation of STAT3 in the development of neurodegeneration.

Keywords: β -amyloid; oligomers; neurotoxicity; neuroinflammation; Alzheimer's disease; STAT3

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative condition characterized by the presence of intracellular neurofibrillary tangles and extracellular neuritic plaques (NP), induced by beta-amyloid ($A\beta$) peptide accumulation. For years, the $A\beta$ aggregation hypothesis has been proposed as the central mechanism underlying the development of the disease, yet it is still controversial [1–3]. $A\beta$ peptides of 37–42 amino acids are released after the proteolytic cleavage of the trans-membrane amyloid β precursor protein ($A\beta$ PP) by the β -secretase enzyme and the γ -secretase complex [4–6]. Despite $A\beta$ 40 and $A\beta$ 42 being the main NP components, $A\beta$ 42 seems responsible for the accelerated peptide nucleation and deposition [7,8]. In general, NPs consist of insoluble $A\beta$ fibrils [9,10]. However, several studies have shown that a wide variety of soluble oligomers are highly toxic, and it has been suggested the existence of an inverse correlation between oligomer size and toxicity [11], $A\beta$ neurotoxicity depends on primary structure and aggregation state. Several reports have indicated that high molecular weight oligomers alter the integrity of the membrane by favoring the generation of ROS and lipid peroxidation. This leads to a decrease in membrane fluidity, intracellular calcium dysregulation, depolarization, and impaired LTP [12]. In contrast, dimers of $A\beta$ are related to Tau phosphorylation, and astrocyte and microglial activation [13]. Finally, $A\beta$ O cause synaptic plasticity dysfunction, cognitive impairment, and cell death through the extracellular interaction with the N-methyl-d-aspartate receptor (NMDAR) [14–16].

Neuroinflammation is another indirect mechanism of $A\beta$ fibrils and oligomers that leads to neurotoxicity and precedes cognitive decline. $A\beta$ is recognized through different receptors located in glial cells, such as the T-cell ligand receptors, NOD-like receptors, formyl peptide receptors, and scavenger receptors [17]. This recognition triggers the clearance of $A\beta$ from the central nervous system (CNS) by the glial cells [18], and activates different signaling pathways to favor the production and release of several proinflammatory mediators like the interleukin-1 beta ($IL-1\beta$), interleukin-6 ($IL-6$), tumor necrosis factor-alpha ($TNF-\alpha$), and interferon-gamma ($INF-\gamma$). These mediators condition the glial immune response to an A1/M1 phenotype, favoring phagocytosis [19], reactive oxygen species generation, apoptosis, inflammasome stimulation, $A\beta$ overproduction in astrocytes, tau phosphorylation, and neuronal damage [20–24].

Several models have assessed the $A\beta$ O toxic effects. Studies using astrocytes and microglial cultures have revealed that $A\beta$ O are potent proinflammatory inducers in glial cells in comparison to fibrils, but the latter could be responsible for chronic inflammation establishment [25,26]. Nevertheless, astrocytes and microglia can release other molecules that switch on neurodegenerative mechanisms related to chronic inflammation.

Signal transducers and transcription activators (STAT) are a family of cytoplasmic factors activated by phosphorylation through the Janus kinases (JAK) pathway, primed by several cytokines. Cytokines such as $IL-6$ induce the JAK2/STAT3 pathway and regulate several transcription factors linked to inflammation [27]. Furthermore, the JAK/STAT pathway immunomodulatory roles have been associated to neurodegenerative diseases, including AD. According to the above, $A\beta$ induces STAT3 activation in neurons favoring cell damage and death [28]. Other studies have proposed that STAT3 activation in astrocytes modifies $A\beta$ clearance or deposition, inflammation, and synaptic disruption [29,30]. Although microglial STAT3 activation is still poorly documented, it has been suggested that STAT3 phosphorylation could be an initial activation event [31].

We investigated the effects of $A\beta$ O on neurodegeneration linked to neuroinflammation along 18 h, 72 h, and 7, 15 and 30 days, after its intrahippocampal microinjection. We aimed to identify STAT3 expression, and our findings suggest an increase of STAT3 expression in glial cell, induced by $A\beta$ O. For this, two JAK2/STAT3 inhibitors were tested in primary cell culture, demonstrating the

relevance of the pathway in astrocytes activation, a process linked to neurodegeneration development. The JAK2/STAT3 pathway modulation could be a promising strategy to control neuronal death, only directed towards astrocytes because if it carried out in neurons could contribute neurodegeneration. Future pharmacological research could focus on the modulation of the signaling pathways that regulate the glial phenotype, this would allow elucidating the neuroinflammation and neurodegeneration process present in AD.

2. Results

2.1. A β -Mediated Neuronal Degeneration

Neuronal degeneration was evaluated with the Fluoro-Jade B (FJB) staining in rats sacrificed at 18 h, 72 h, and 7, 15, and 30 days after A β O microinjection. As shown in Figure 1A, A β O promoted a significant increase of FJB positive cells ($p < 0.05$), compared with saline solution treatment at 18 h in the CA1 region. After 72 h, the number of FJB positive cells decreased in A β O and SS groups, remaining discretely higher ($p < 0.05$) in rats injected with A β O. Although the CA1 region showed an apparent increase of FJB cells in the A β O group at day 7, the difference was not significant. In contrast, FJB positive cells were evident in the dentate gyrus (DG) region of A β O microinjected rats sacrificed at 72 h and 7 days post-injection. Even though there is an apparent reduction of FJB cells in this time window, the statistic analysis did not show differences between the two sacrifice time points.

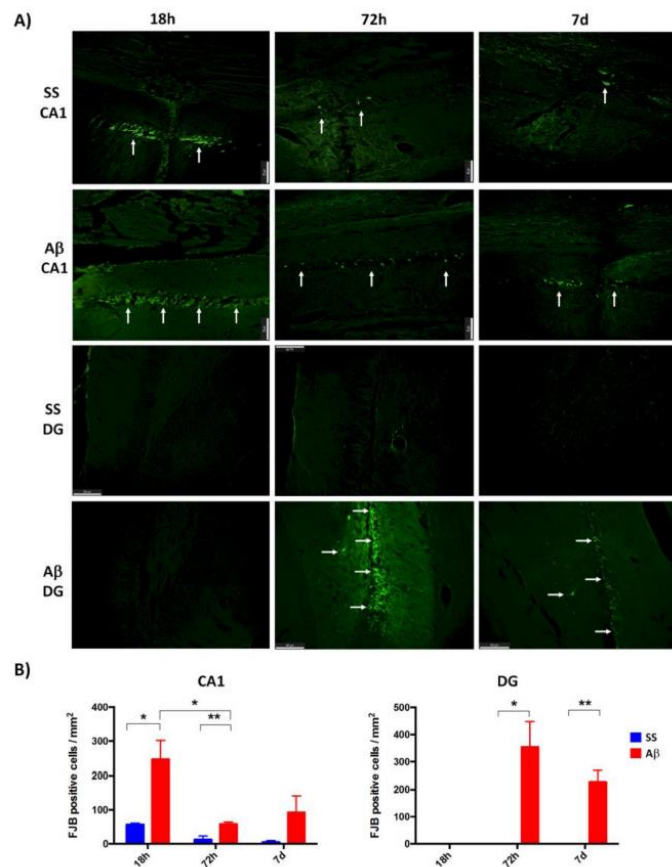


Figure 1. Quantification of degenerated neurons. FJB staining was used to identify neurons undergoing neurodegeneration in CA1 and DG. (A) Representative images (20×) of SS and A β rats sacrificed after 18 h, 72 h and 7 days are shown (Scale bar = 50 μ m, white arrows mark FJB positive cells). A β oligomers promote increased cell death in both regions more than SS. (B): Quantitative analysis ($n = 3$) in CA1 show a higher FJB stain in oligomers rats at 18 h and decreased at 72 h. Meanwhile, in DG, FJB positive cells were only detected in A β rats sacrificed after 72 h. Data of FJB positive cells/mm² are presented as mean with the standard error of mean (SEM) bars. Significance level * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, are marked.

The FJB stain decreased at 15 and 30 days, after microinjection of A β O (data not shown). For this reason, we quantified the neuronal nuclei protein (NeuN) positive cells in the hippocampus (Figure 2A), at these two time points, a reduction of NeuN positive cells in CA1 after A β O injection was evident at both times as compared with the control group (SS) ($p < 0.05$) (Figure 2B).

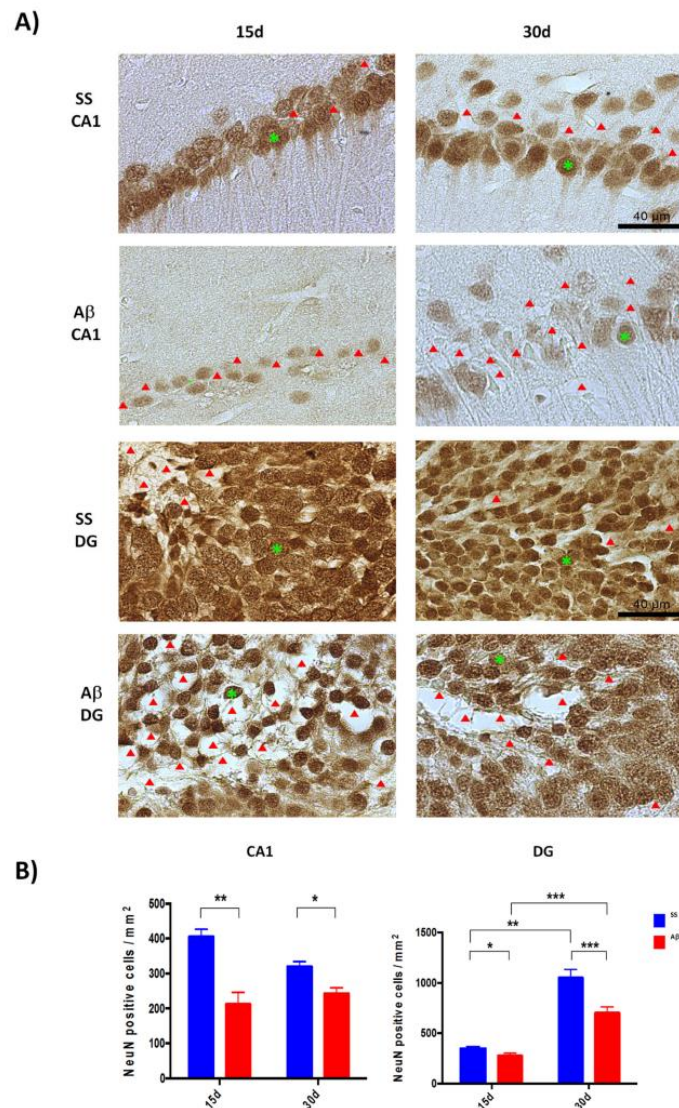


Figure 2. Quantification of mature neurons. Brains sections were immuno-stained for NeuN. CA1 and DG regions of rats sacrificed 15 and 30 days after SS or A β microinjection were evaluated. (A): Representative 40 \times images show that A β oligomers favor neuron loss in both regions (a green asterisk point one NeuN positive cell in each image, red arrowheads represent spaces of apparent neuronal loss). (B): Quantitative analysis ($n = 3$) suggests a recovery of NeuN positives cells in DG between 15 and 30 days. Data of NeuN positive cells/mm² are presented as mean with SEM bars. Significance level * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ are marked.

Furthermore, immunohistochemistry (IHC) evidenced neuronal death, some dystrophic neurites and pyramidal cell disarray promoted mostly by A β O compared with the SS injection. Also, we found a moderate decrease of NeuN positive cells between 15 and 30 days in control groups ($p < 0.05$). A β O-injected rats showed a higher neuronal loss over time. The spaces in the preparations left by dead cells were detected mainly in DG of rats treated with oligomers and sacrificed at day 15, correlating with a significant decrease of NeuN positive cells in A β O group ($p < 0.05$) (Figure 2B). Such neuronal loss was less evident after 30 days of oligomers microinjection, in agreement with an increase of NeuN positive cells ($p < 0.05$). This observation may be related to a recovery phenomenon in the DG region [32], which is a neurogenesis niche.

2.2. Acute and Chronic Cellular Response Mediated by A β Oligomers

A theory for A β O toxicity is by means of glial activation, which induces an inflammatory microenvironment and thus neurodegeneration. We therefore sought to identify the presence of mature neurons with an anti-NeuN antibody, microglial cells with an anti-Ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) antibody, and an anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody to detect astrocytes.

In Figure 3, images from the acute cellular response in the DG show that, at 18 h, A β O (Figure 3B) promotes an increase of GFAP and Iba1 immunoreactivity, while NeuN cells showed a slight reduction compared with the saline solution group (Figure 3A). The mechanic injury by itself increased astrocytes and microglial cells in the control group. However, in the A β O group, we found a high number of swollen ramified Iba1 cells and few with spherical morphology. We also found an increased number of GFAP cells with hypertrophy of body and stem processes. These morphological changes are signs of glial activation. After 72 h, GFAP and Iba1 staining decreased in the SS group (Figure 3C) in comparison with the previous time point. Interestingly, A β O maintains the number of GFAP and Iba1 cells, preserving the activated morphology (Figure 3D). These changes relate to a reduction of DG density and NeuN staining.

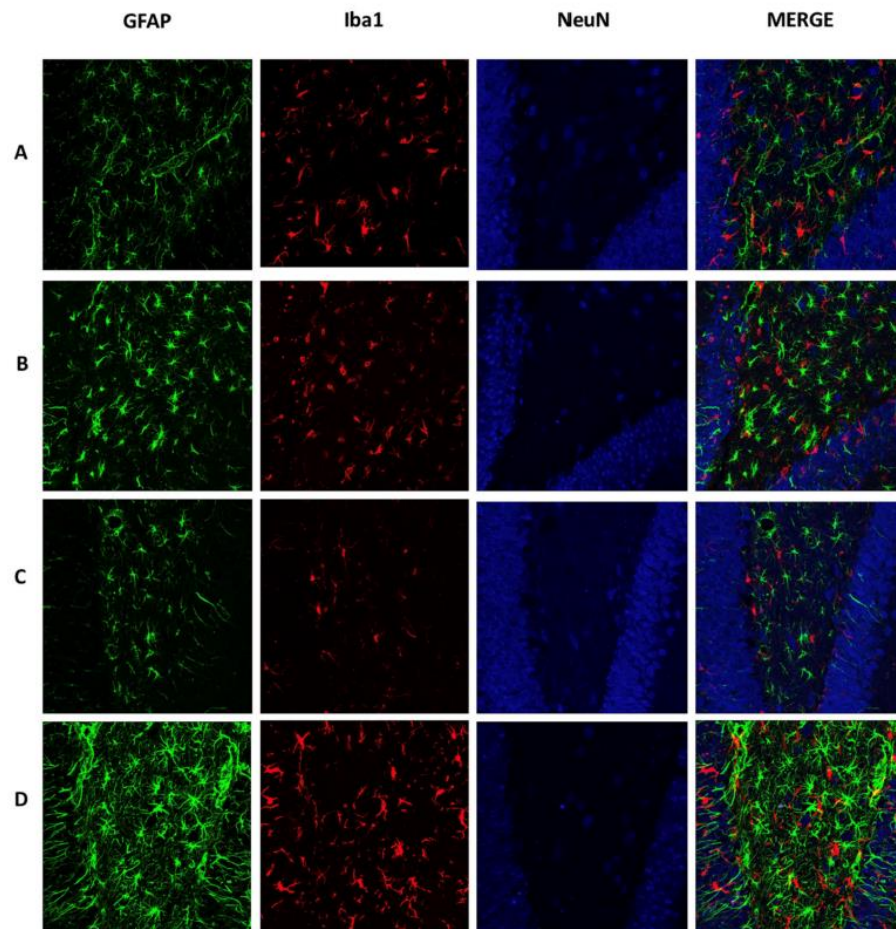


Figure 3. Acute cellular response mediated by A β O. Brain sections were immunolabeled to detect mature neurons (Anti-NeuN, Cy5), astrocytes (Anti-GFAP, Alexa 488), and microglia cells (Anti-Iba1, Alexa 555). Representative images (40 \times) of DG show the cellular response in the groups: (A) SS 18 h, (B) A β 18 h, (C) SS 72 h, and (D) A β 72 h. A β O treatments (B and D) increase astrocytes and microglial cells, as well as neuronal density in DG.

The immunofluorescence at day 15 showed a reduction of astrocyte hypertrophy in the control group as compared to day 7 (Figure 4C). Similarly, the number of NeuN positive cells was reduced significantly in A β O microinjected rats (Figure 4D). Also, the number of hypertrophic astrocytes and swollen ramified microglial cells was doubled on day 15. Some of these Iba1 cells are close to neuronal loss spaces (Figure 4D). The control group (Figure 4E) showed a reduction in the number of Iba1 positive cells while A β O promoted a higher number of Iba1 positive cells with spherical or amoeboid morphology at day 30 (Figure 4F). Even though GFAP staining in the A β O group is similar to that in control, we found differences in the astrocyte's morphology of oligomer-injected rats (hypertrophy). Additionally, NeuN staining decreased in comparison to the control group, but neuronal loss spaces were fewer compared to the observed at day 15. This result can also relate to a recovery phenomenon proposed in the NeuN quantification between 15 and 30 days.

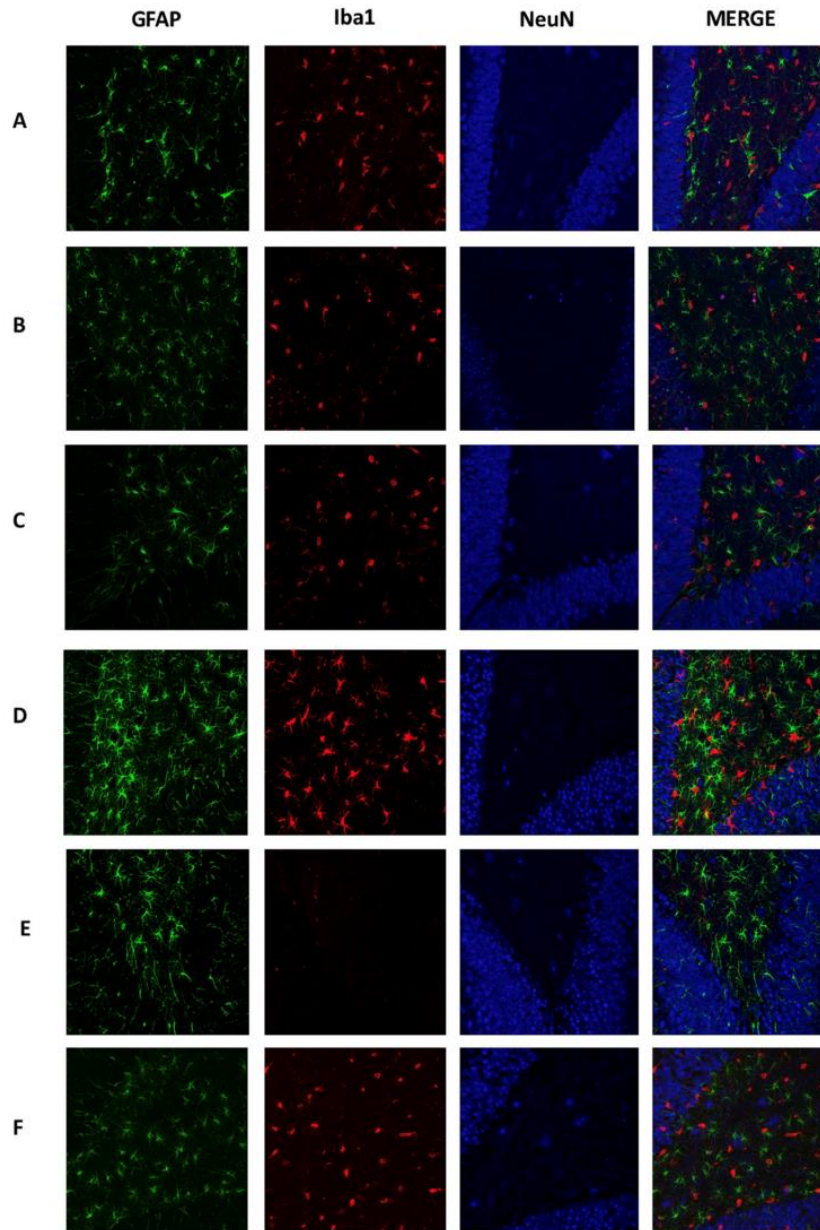


Figure 4. Chronic cellular response mediated by A β O. Brain sections were immunolabeled to detect mature neurons (Anti-Neun, Cy5), astrocytes (Anti-GFAP, Alexa 488), and microglia cells (Anti-Iba, Alexa 555). Representative 40 \times images of DG show cellular response in the groups: (A) SS 7 d, (B) A β 7 d, (C) SS 15 d, (D) A β 15 d, (E) SS 30 d, and (F) A β 30 d. Hypertrophic astrocytes were higher in A β O-injected rats (B, C, and D) with concomitant activation of microglial cells and a reduction of the neuronal density in DG.

2.3. Ultrastructural Analysis

Transmission electron microscopy allowed us to analyze the time course of ultrastructural changes induced by A β O. A β O favored neuronal loss in rats at 18 h when compared to the control group, where the cellular structure was conserved as shown with FJB staining (Figure 5A).

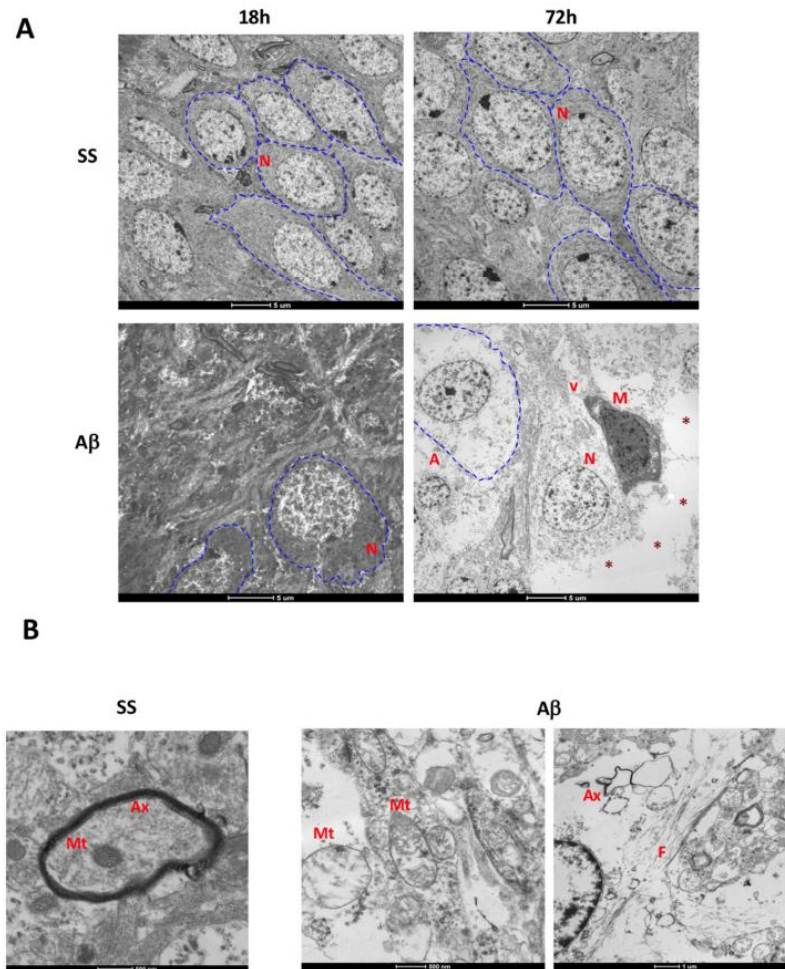


Figure 5. Acute ultrastructural analysis. (A) Transmission electron micrographs (Scale bar: 5 μ m) of 18 h and 72 h are shown. Blue dashed lines identify at least one neuron (N) in each image. After 18 h, A β O decreases neuron density. At 72 h, neuronal loss spaces are evident (red asterisks), in addition to swollen astrocytes (A), and the presence of vacuolated microglial cells (M). (B) Magnification at 72 h show the presence of swollen mitochondria (Mt), axon (Ax) degeneration, vacuoles in the neuropil, and fibrils (F) in the A β O group.

Despite the mechanic injury in the control group, cellular ultrastructure and density remained conserved after 72 h. Edema and vacuoles in the neuropil were evident in oligomer-treated rats, suggesting neuronal loss. Also, neurons suffered severe cytoplasm disruption followed by loss of organelles, such as endoplasmic reticulum and mitochondria. Moreover, we detected swollen astrocytes and vacuolated microglial cells surrounding neurons on the degeneration process, correlating with the activated morphology observed by immunofluorescence. Other observations at this time after A β O injection were the presence of swollen mitochondria, axon degeneration, and amyloid-like fibrils, whereas these were absent in the control group (Figure 5B).

At day 7, the A β O group showed the presence of vacuoles in the neuropil, endoplasmic reticulum disruption, axonal degeneration, abundant neuronal loss spaces, vacuolated microglia, and cytoplasm disruption (Figure 6A). In addition to these changes, swollen mitochondria and activated microglia close to amyloid-like fibrils were observed (Figure 7A). The control group only exhibited vacuoles in the neuropil.

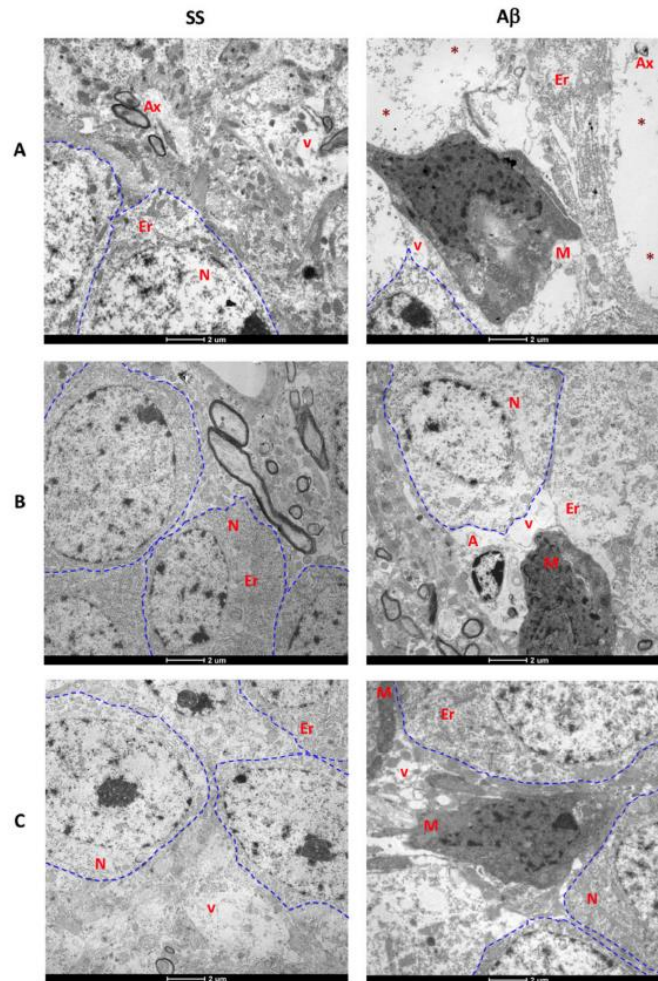


Figure 6. Ultrastructural analysis in chronic days. Transmission electron micrographs (Scale bar: 2 μm) of (A) 7 d, (B) 15 d, and (C) 30 d are shown. Blue dashed lines identify at least one neuron (N) in each image. In general, A β oligomers induce microglial (M) activation, disruption of cytoplasm and endoplasmic reticulum (ER) in rats sacrificed at 7, 15, and 30 days after injection. At day 7, oligomers promote an increased number of vacuoles (v) in the neuropil and neuronal loss spaces (red asterisks). These spaces are less evident in A β O rats sacrificed at day 15, but swollen astrocytes (A) and vacuolated microglial cells were found. At day 30 some of these cells were still present, but neuron loss, cytoplasm disruption, and alterations in endoplasmic reticulum were less evident.

After 15 days, we found an apparent structural recovery in the SS and A β O rats (Figure 6B). The control group showed greater preserved neurons than control animals sacrificed on day 7. In contrast, the 15 day-A β O rats exhibited vacuoles and disruption of ER and cytoplasm, in addition to swollen astrocytes and vacuolated microglia. Amplified images (Figure 7B) showed axon degeneration, vacuolated microglial processes, and decreased mitochondrial dysfunction.

Interestingly at day 30, microstructural recovery was observed in the cytoplasm and mitochondria of neurons in A β O-injected rats. However, activated microglia and axonal degeneration persisted, none of these changes were found in the control group (Figures 6C and 7C).

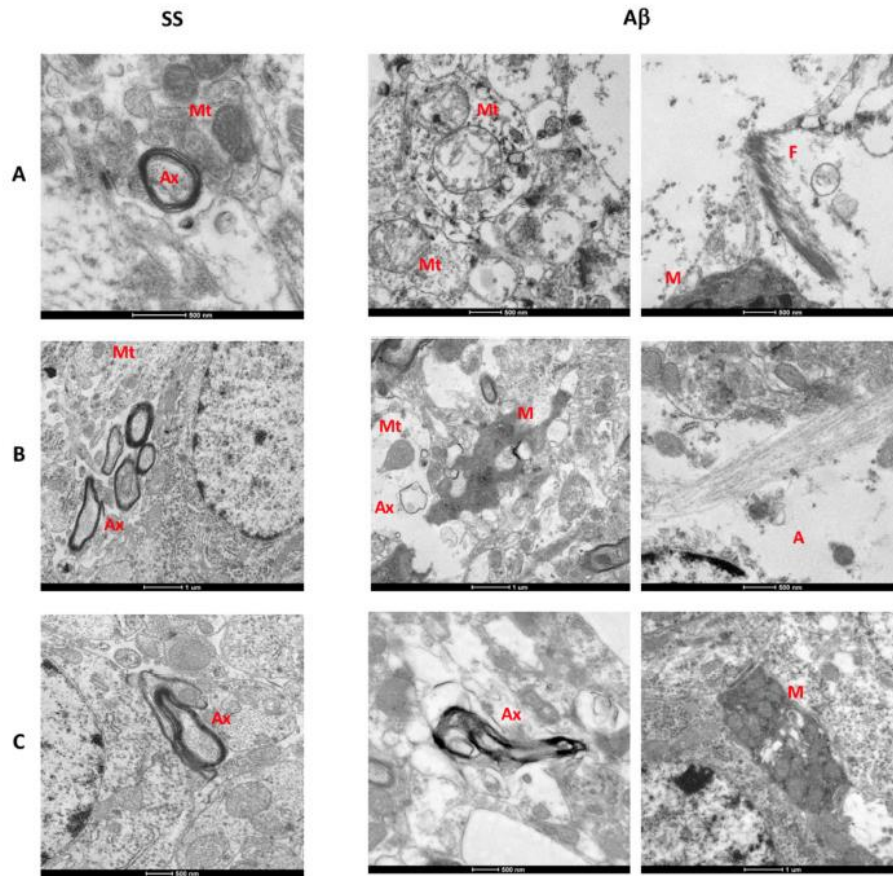


Figure 7. Additional ultrastructural abnormalities. Electron micrographs (Different scale bars) of (A) 7, (B) 15, and (C) 30 days are shown. Fibrils (F), axon (Ax) degeneration, mitochondrial (Mt) abnormalities and vacuolated microglial (M) cells are present in rats sacrificed after 7 and 15 days of A β O injection. At day 15, we observed microglial processes with vacuoles and swollen astrocytes (A). At day 30 post-injection, cytoplasm disruption, and neuronal loss decreased, but few activated microglia and axon degeneration persisted.

2.4. Molecular Inflammation Mediated by A β Oligomers

Glial cell activation by A β O leads to the release of several inflammatory mediators. For this reason, we quantified the proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, and the anti-inflammatory IL-10 in rat hippocampus homogenates using ELISA. No significant differences of IL-1 β and IL-10 between the rats microinjected with A β O nor saline solution at 18 h, 72 h, and 7 and 15 days (Figure 8A) were observed. An increase of release of the three cytokines ($p < 0.01$ for IL-1 β and IL-10, $p < 0.05$ for IL-6) was noticed in A β O rats sacrificed at day 30.

IL-6 levels in A β O-injected rats decreased in 18 h, 72 h, and 7 d. Next, we evaluated IL-6 transcripts by qPCR (Figure 8B). In contrast to the protein expression, IL-6 mRNA levels were higher in oligomer-injected rats after 18 h ($p < 0.001$), 72 h ($p < 0.001$), 7 days ($p < 0.001$), and 30 days ($p < 0.01$).

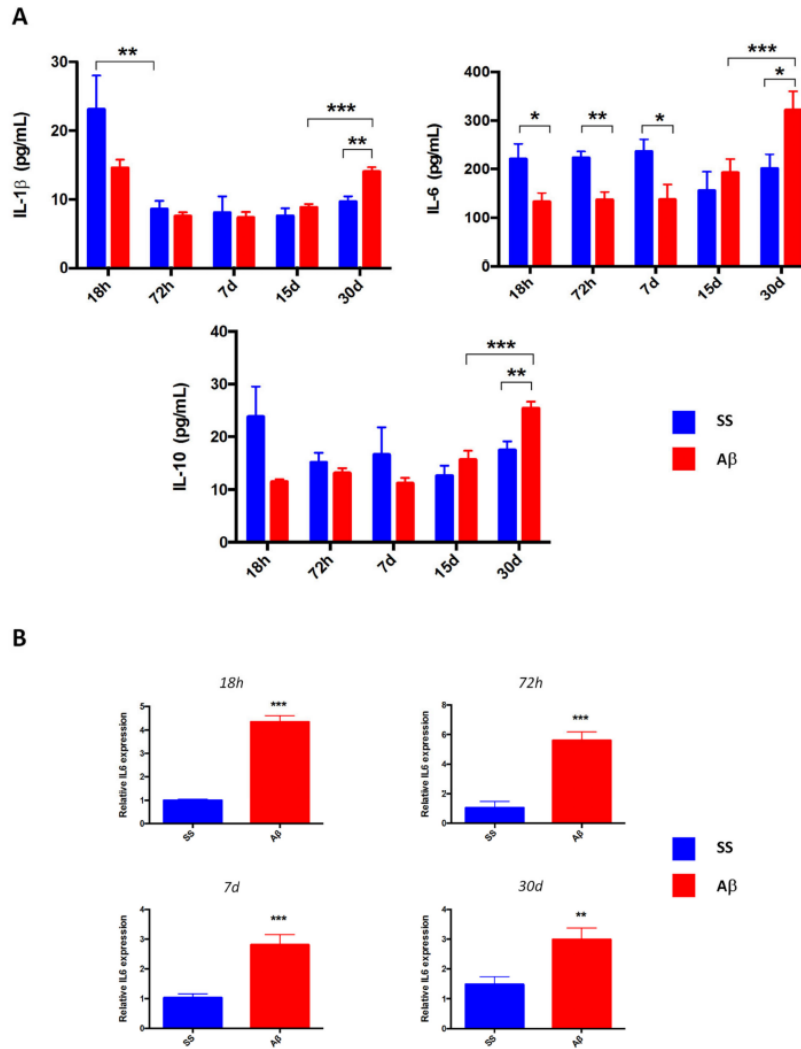


Figure 8. Cytokine quantification and IL-6 expression. (A) Quantitative analysis in hippocampus homogenates ($n = 4$) reveals an increased release of IL-1 β , IL-6, and IL-10 after 30 days of A β O microinjection. Interestingly, IL-6 decreased in A β groups sacrificed after 18 h, 72 h and 7 days. (B) qPCR analysis ($n = 6$) shows an increased IL-6 mRNA relative expression in A β rats sacrificed at 18 h, 72 h, 7 days and 30 days. Cytokine levels (pg/mL) are presented as mean with SEM bars. IL-6 mRNA expression was normalized with β -actin. Data are expressed in average fold change with SEM bars. Significance level * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ are marked.

2.5. A β Oligomers Promotion of STAT3 Expression in Glial Cells

We next aimed to identify if the IL-6 signaling downstream transcription factor STAT3 was activated. Previously has been reported that STAT3 participate inducing neuronal death [28], for this we evaluated total STAT3 expression by IHC. After 18 h from sacrifice small STAT3 positive cells were distributed in hippocampus and cortex parenchyma, in rats microinjected with saline solution or A β O (Figure 9A). Most of these cells display an infiltrate-like morphology with nuclear immunoreactivity, being slightly higher in A β O rats.

At 72 h after microinjection (Figure 9B), an evident STAT3 expression in cells with glial morphology was observed in the hippocampus of A β O group; some of these cells presented swollen cytoplasm and

immunoreactivity in the nuclei. In the respective control group, only a few positive infiltrate-like cells were observed.

The 7-day control group rats (Figure 9C) exhibited neuronal STAT3 expression with cytoplasm distribution. By contrast, STAT3 in A β O rats was restricted to glial cells, which displayed clearer activated morphology and nuclear immunostaining than the previous time.

High IL-6 mRNA levels (Figure 8B) correlate with an increased glial STAT3 expression in A β O rats sacrificed at 18 h, 72 h and 7 days (Figure 9); these results suggest JAK-STAT3 pathway activation, although cytokine levels were low at the same times (Figure 8A).

Furthermore, results from A β O rats at day 15 suggest a high glial STAT3 expression in CA1 and DG, similarly with day 7. These cells display a hypertrophic morphology, not presented by saline solution rats (Figure 9D).

Few STAT3 glial cells with resting morphology were detected in the cortex of control rats at day 30 (Figure 9E). A β O-injected rats exhibited more STAT3 glial cells in the hippocampus, although some of them had an activated morphology and nuclear staining, the latter was decreased in comparison to A β O rats sacrificed at previous times.

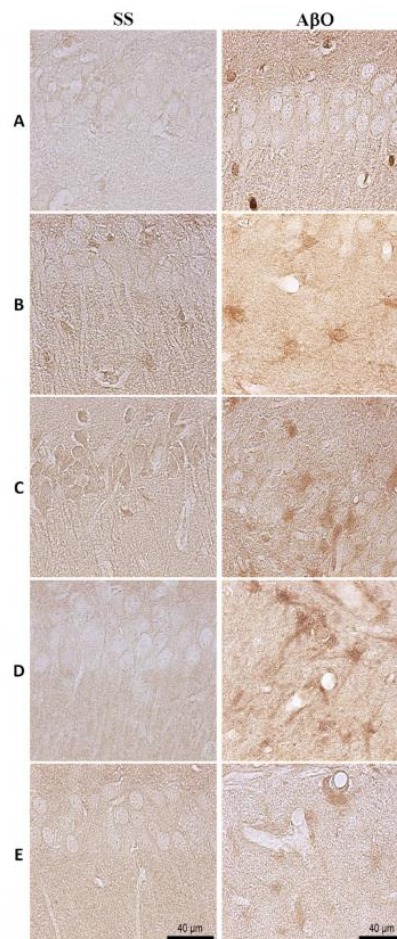


Figure 9. STAT3 expression in the hippocampus. Representative IHC (40 \times) images (scale bar = 40 μ m), show a higher expression of STAT3 mediated by A β O at (A) 18 h, (B) 72 h, (C) 7 d, (D) 15 d, and (E) 30 d, after microinjection. At 72 h, STAT3 positive cells with glial morphology were identified, with a hypertrophic morphology demarked at day 7 and 15. Some of these cells showed STAT3 nuclear expression.

To identify STAT3 localization, we performed immunofluorescence at 72 h and 7 days, where we detected consistent neuronal death. The vast majority of STAT3 positive cells were astrocytes and presented nuclear stain (Figure 10). Interestingly, on day 7, we detected STAT3 nuclear staining in some neurons of the CA1 region, which was not observed before with IHC. Certainly, STAT3 cytoplasmic expression in the control group rats was confirmed.

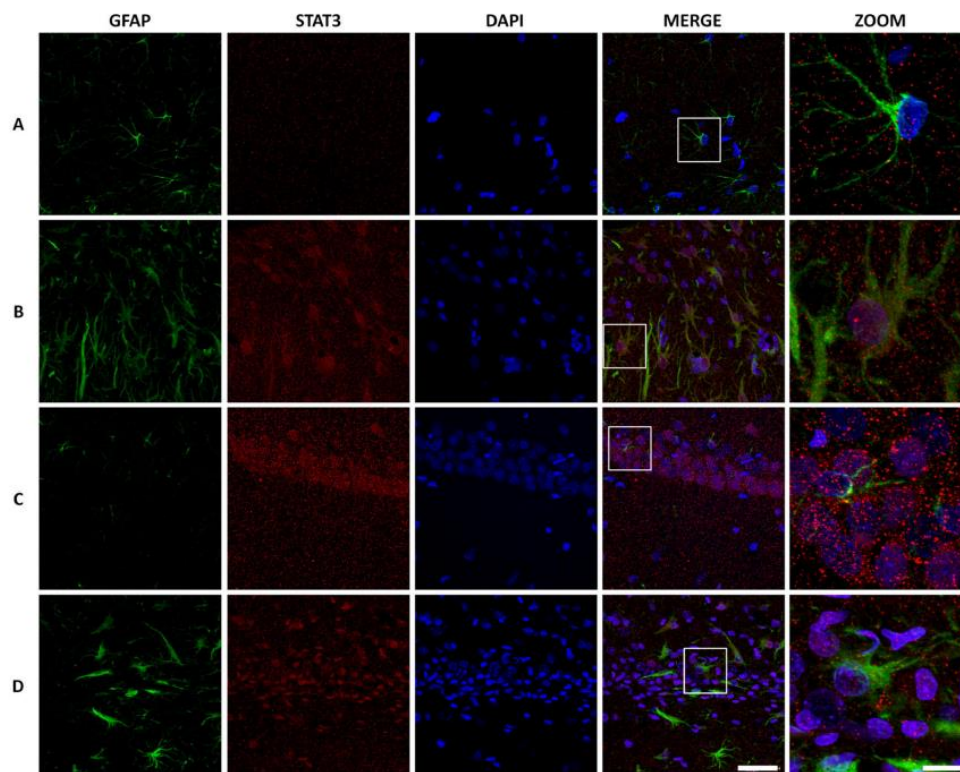


Figure 10. STAT3 expression in astrocytes. Immunofluorescence representative 63 \times images with digital zoom (scale bar 63 \times images = 40 μ m, zoom = 10 μ m) show an increased nuclear STAT3 expression (Alexa 555) in astrocytes mediated by A β O (Alexa 488), 72 h and 7 days after microinjection. The 7 day-saline solution control showed a cytoplasm STAT3 expression as previously observed in IHC.

2.6. STAT3 Inhibition Assay in Hippocampal Primary Culture

An inhibition assay was conducted to evaluate the STAT3 expression in neurons and astrocytes exposed to A β O. Considering our previous results, we decided to expose a primary mixed hippocampal culture for 72 h to a 20 μ M A β O solution from the human peptide.

We initially used AG490 (25 and 50 μ M), a JAK2 inhibitor, without detecting significant changes in total STAT3 expression in cultures both exposed to A β O and to AG490 25 μ M+A β O (Figure A1). However, with the AG490 25 μ M+A β O treatment, we observed a decrease in activated astrocyte morphology and the presence of more mature neurons compared to A β O. Although the inhibitor at 50 μ M (Figure A2) promoted an evident reduction of the expression of total STAT3 in the cells exposed to A β O and the change in astrocyte's morphology was also detected, the number of neurons was lesser than in the culture only exposed to A β O.

Next, we decided to probe Stattic, a small-molecule inhibitor of STAT3 expression [33] at different dilutions (5, 10, and 20 μ M) to determine maximal inhibition concentration (Figure 11). Stattic inhibited STAT3 expression in a dose-dependent manner (Figure 11C–E), at 10 and 20 μ M, expression of STAT3 increased in neurons and astrocytes of A β O-injected rats (Figure 11B). Noteworthy, at 10 and 20 μ M

we observed a deleterious effect in neuronal (MAP2-positive cells) and astrocytes (GFAP-positive cells) survival. For this reason, we used Stattic at 5 μM to probe the effect under A β O exposition.

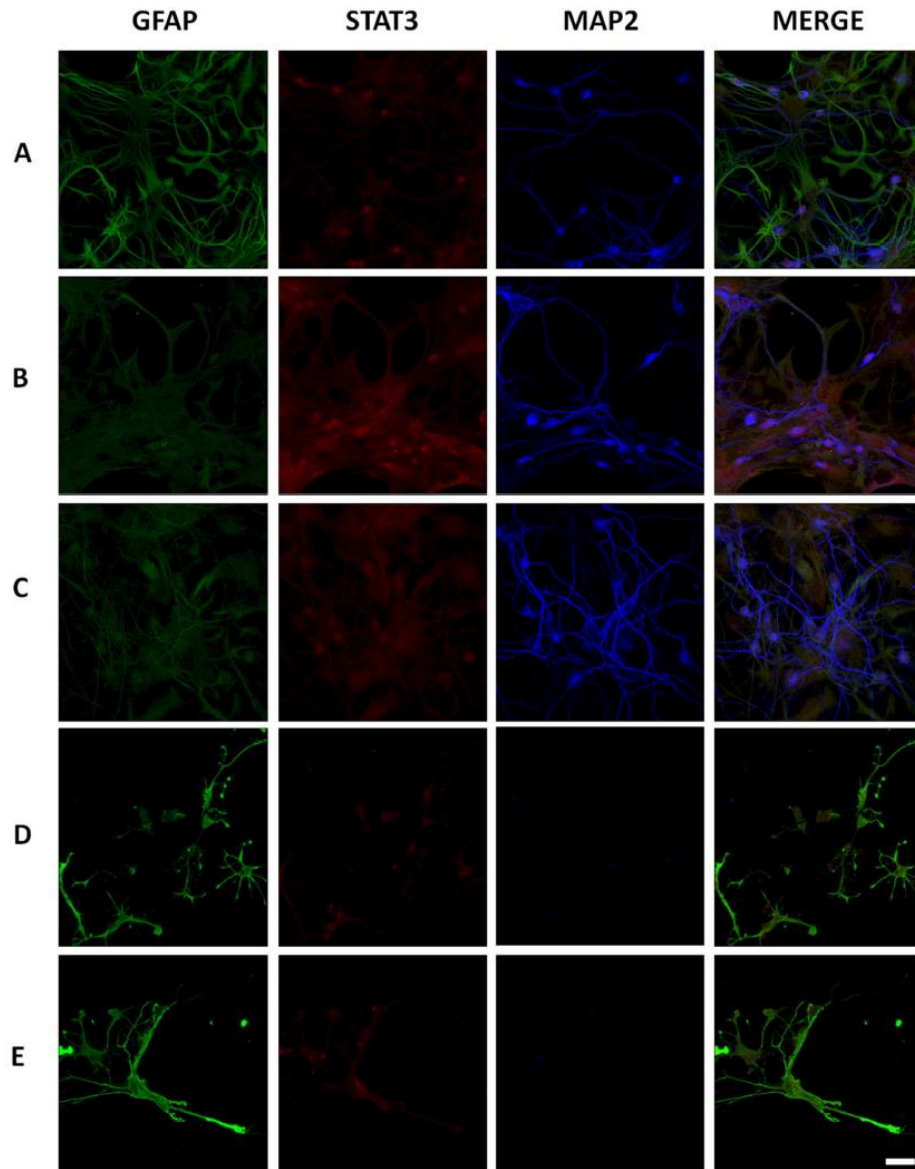


Figure 11. Stattic effect on primary hippocampal culture. Immunofluorescence representative 40 \times images (Scale bar 40 \times images = 40 μm) of Stattic inhibition probe in the concentrations 5 (C), 10 (D), and 20 μM (E) were contrasted to vehicle (A) and A β O (B) treatments. At the low-dose Stattic concentration, total STAT3 (Alexa 555) expression decreased in astrocytes (Alexa 488) and neurons (Cy5) compared with culture exposed to A β O. High doses of Stattic (D, E) promoted a decrease in astrocytes and neuron survival.

On 5 μM Stattic incubation, STAT3 (Figure 12B) was expressed in all cells, which preserved the morphology and the number of astrocytes (GFAP) and neurons (MAP2), similar to the vehicle (Figure 12A). In contrast, A β O exposure favored neuronal death and an increase in STAT3 expression in GFAP positive cells (Figure 12C). When the inhibitor was added before A β O (Figure 12D), it promoted

a decrease of STAT3 expression in astrocytes. In addition to these changes, the inhibitor prevented the death of neurons (Figure A3). A higher integrated density was detected in cell cultures treated with A β O ($p < 0.05$) in comparison to vehicle, Stattic, and Stattic+A β O (Figure 12E). The Astrocytes of A β O exposed cultures (Figure A3) presented a higher integrated density of total STAT3 immunoreactivity than the other treatments ($p < 0.05$). In contrast, in neurons, we identified a significant reduction in STAT3 integrated density in A β O treated cultures ($p < 0.05$).

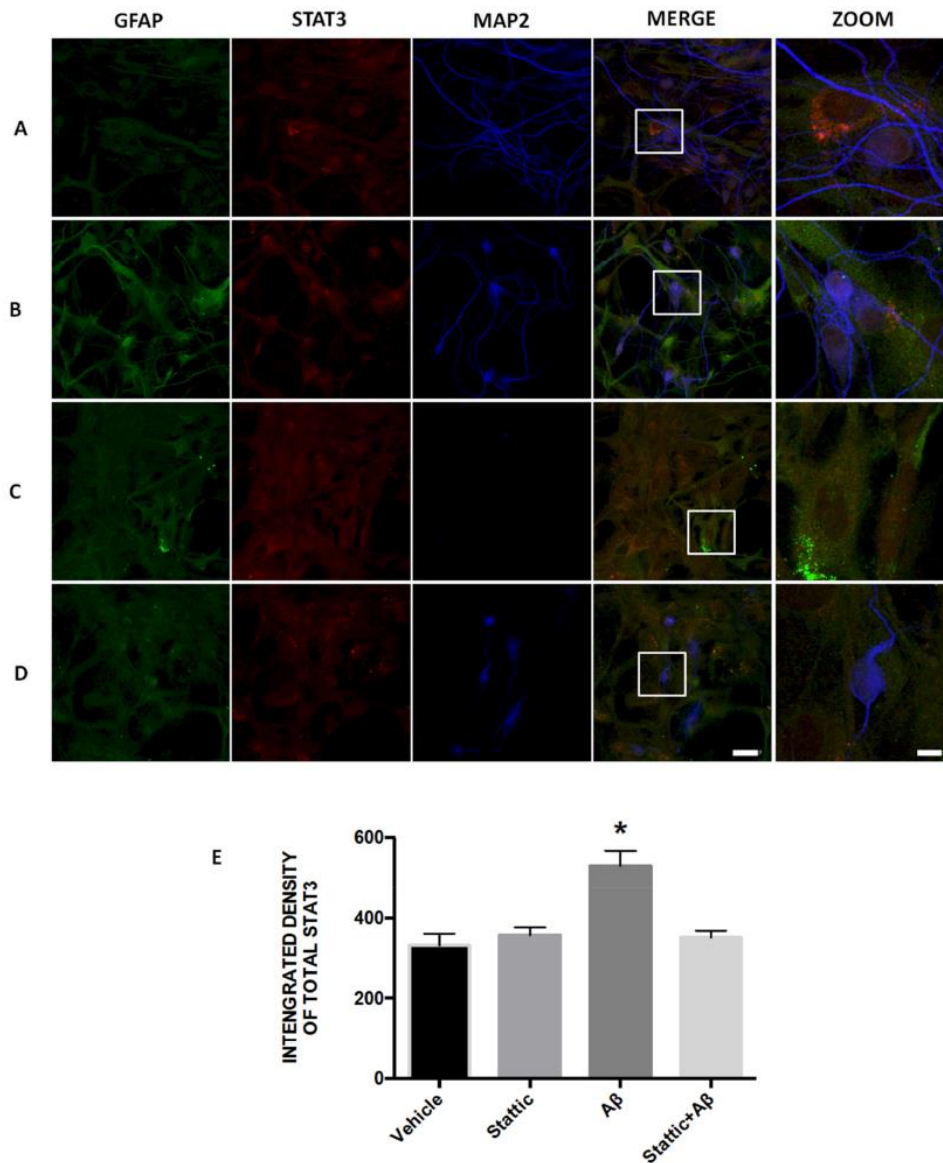


Figure 12. STAT3 inhibition assay. Immunofluorescence representative 40x images with digital zoom (scale bar 40x images = 40 μ m, zoom = 10 μ m) of inhibition assay in primary hippocampal cultures, before 72 h of exposition to (A) vehicle, (B) Stattic 5 μ M, (C) A β O 20 μ M, and (D) Stattic+A β O. Total STAT3 expression (Alexa 555), astrocytes with GFAP (Alexa 488), and neurons with MAP2 (cy5) were monitored. (E) Integrated density of Total STAT3 immunoreactivity. Data are means \pm SEM ($n = 4$). One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test (* $p < 0.05$).

3. Discussion

Several AD genetic models have been developed to investigate A β toxicity. It has been thought that only A β fibrils or plaques could induce neuronal death in transgenic mice [34]. However, some authors have demonstrated the relevance of non-transgenic models based in an intracerebroventricular (ICV) or intrahippocampal A β O microinjection using non-human primates and rodents [35–43]. The main advantage of these models is the time it takes for damage to be apparent. We chose this approach to study the molecular mechanisms involved A β O toxicity, using a rat intrahippocampal microinjection model. Detrimental effects were observed at 24 h of a single microinjection of the A β 1-42 oligomers in the rat retrosplenial cortex compared with controls rats, albeit the effect was restricted to the injured region [41]. In this model, a single injection of A β O in CA1 activated the degeneration process, which continues until 30 days after surgery, which allowed the evaluation of the chronic damage generated by A β O. Neuronal degeneration was lower in the control group despite receiving the same mechanic damage, demonstrating the potential of A β O to induce neuronal death through several extracellular and intracellular mechanisms [15,16,44,45].

Another way of A β O-induced neuronal death comes from astrocytes and microglia proliferation and activation. It has been proposed that both cells could mediate the A β aggregates phagocytosis, particularly fibrils, displaying a protective role. In contrast, A β O could induce a deleterious inflammatory microenvironment that exacerbates neurodegeneration, with impaired phagocytic activity [18,19,25,46,47]. The method of A β oligomerization starting from the synthetic A β 1-42 human peptide used in the present project was extensively documented for the obtention of soluble globular oligomers [48], which were corroborated by electron microscopy (data not shown). Conducting the oligomer size analysis in a gradient 10–20% SDS-PAGE allowed us to identify low molecular weight oligomers (<17 KDa) and monomers (data not shown). Nonetheless, we cannot discard the presence of high molecular weight oligomers or protofibrils. In this sense, it has been controversially discussed that SDS affects the oligomerization state of A β . For this reason, in future works, it will be necessary to conduct a photo-induced cross-linking of unmodified proteins previous to SDS-PAGE or realize an oligomer characterization by ion mobility coupled to electrospray ionization mass spectrometry [49,50].

Results show that our A β O preparation promoted astrocyte and microglia proliferation. The relation between glial activation and neurotoxicity was the presence of hypertrophic astrocytes and microglial cells with swollen or amoeboid morphology, and neuronal loss. The highest number of activated glial cells was observed at 72 h, correlating with extensive degeneration visualized in DG with the FJB staining. Interestingly, the proportion of activated astrocytes was higher than microglia, though this myeloid cell was located near to neuron loss spaces. Several reports have suggested that activated astrocytes could contribute to A β production and aggregation [51,52]. A recent work elucidated that astrocytes stimulated by A β O undergo an increase of BACE1 and ApoE expression [46].

The ultrastructural analysis allowed us to validate the close relation between neuronal alterations and glial activation. At 18 h, neuropil alterations and the low number of neurons correlated with the increased neurodegeneration observed by FJB staining. Also, significant changes in neuron morphology are reflected by cytoplasm disruption and loss of organelles, accompanied by surrounding hypertrophic astrocytes. Moreover, a high degree of disruption of myelin sheaths also suggests axon degeneration. Changes of the inner membrane and cristae of mitochondria are synonymous of mitochondrial dysfunction. Both abnormalities induced by A β aggregates have been previously described [53,54]. Spaces of neuronal loss were associated with activated microglial cells containing organelle debris inside vacuoles, remarking the role of microglial cells in A β O-mediated neurotoxicity.

The presence of amyloid-like fibrils, as well as of intracellular A β O, should be confirmed in future experiments of immunoelectron microscopy in the A β O rats. There is a high probability that a part of the A β O preparation could form fibrils due to the physiological temperature and pH conditions of rat brain tissue. This is supported by the fact that we were able to identify activated microglia near those fibrils and that they were not observed at later times, probably due to phagocytosis.

Although at day 30 in A β O rats, a reduction in cytoplasmic alteration was observed, A β continued exerting neurotoxicity effects and promoting inflammation, due to the presence of axonal degeneration, as well as microglia with amoeboid morphology and organelle phagocytosis, suggesting that A β is capable of inducing chronic neuronal death, altering DG neurogenesis, and decreasing cell proliferation [55].

Considering the presence of glial activation in all the evaluated times, we quantified IL-1 β , IL-6, and IL-10, which have been associated with beneficial or detrimental activity related to A β aggregates neurotoxicity [56–58]. In our model, the A β O or saline solution groups brought under a mechanical injury that promoted glial activation. However, this damage was lesser in the control group, which could explain why we did not observe significant differences in IL-10 and IL-1 β levels in both groups at acute times.

About the IL-1 β and IL-6 significant increase in A β O rats at day 30, we suggest these proinflammatory cytokines mostly derive from the high number of activated microglial cells. Previous reports have indicated the IL-1 β role in the induction of glial activation and neuron damage [59]. Despite IL-1 β overexpression may favor A β clearance [57], it may also contribute to tau phosphorylation [60]. A similar effect of A β O clearance was described for IL-6 by mediating gliosis [51], extending the neuron loss induced by the presence of A β and the overstimulation of NMDAR [61]. It is possible that the release of these cytokines would be related with the absence extracellular amyloid-like fibrils as observed at 72 h and 7d. Even though, this is not suggestive of A β clearance from the hippocampus and we consider this to be an important issue to address in the near future.

IL-10 is a cytokine, which reduces inflammation and apoptosis. For this reason, it has been proposed as a possible therapeutic target in several CNS disorders, such as AD [62]. However, IL-10 overexpression in APP transgenic mice or its deletion in APP/PS1 mice revealed that the anti-inflammatory effects would be detrimental by reducing A β O clearance by microglial cells [56,63] because the effectiveness of this process is promoted by an inflammatory microenvironment.

In the present study, IL-10 expression was observed in A β O rats after 30 days and could be favoring neuron density as well as decreased neuron alterations aforementioned. Despite IL-10 expression, confocal electron microscopy showed that phagocytosis was not diminished in microglia, which may be due to high levels of IL-1 β and IL-6. This data suggests the need for a balance in the cytokine microenvironment, rather than a predominant inflammatory profile.

IL-1 and IL-6 are proinflammatory cytokines; however, the role of both plays in the inflammatory process may be different. It is known that IL-6 is a pleiotropic cytokine. Reported studies indicate that the overexpression of IL-6 in CNS generates the presence of reactive gliosis that can lead to neurodegeneration. On the other hand, it is known that IL-10 has a fundamental role in limiting chronic and acute inflammation. However, under pathological conditions, it is known that the levels of pro- and anti-inflammatory cytokine may be elevated. This has been demonstrated in the CSF of patients with AD [64]. However, these findings have failed to elucidate whether the presence of A β is associated with a poor response of innate immunity, which could accelerate the cascade of pathological events, or if neuroinflammation is due to a mechanism of rescue that attempts to eliminate the accumulation of toxic amyloid species, through the activation of glial cells. This alteration of the immune response would prevent the elimination of accumulated peptides and lead to altered production of cytokines, which favor the neurodegenerative process. Moreover, the presence of pro- and anti-inflammatory molecules would be the result of a change in the cytokine profile, closely related to the pathophysiology of the disease, in the particular case of this model, with the presence of A β O aggregates.

An interesting finding of our experiments was a reduction of IL-6 in A β O rats from 18 h to 7 days. For this reason, we contrasted these results with relative IL-6 mRNA expression, detecting high mRNA levels in A β O administrated rats compared with the control group.

It has been documented that the underestimation of cytokine production is possibly due to cellular consumption in cytokine quantification by ELISA [65], which could involve processes of cytokine binding to its receptor or protein degradation. In this sense, some molecular mediators (IL-6, IL-1 β ,

TNF α , among others) display two receptor types: a transmembranal receptor, which activates the classical signaling pathway; and a soluble receptor, which induces the trans-signaling. If the cytokine is bound to its soluble receptor in a biological sample, it typically cannot be quantified with an immunoassay-based measurement [66].

We think that 18 h to 7 days, exists the possibility that IL-6 could be bound to its soluble receptor, making difficult the protein determination by ELISA multiplex assay. Considering that IL-6 was activating the trans-signaling pathway we identified STAT3 expression, a key transcription factor of the IL-6 signaling. A previous report of A β aggregated microinjection in mice and cell culture exposition showed that A β induces STAT3 activation through tyrosine phosphorylation (p-Tyr STAT3), leading to apoptosis only in neurons [28]. Some oligodendrocytes and infiltrates were the first STAT3 positive cells detected after microinjection, probably as part of the inflammatory response initiated after the needle injury. At the same time, A β O promoted a slight increase in STAT3 nuclear expression. Although only total STAT3 expression was identified, nuclear accumulation of this factor is a signal of activation [30,67].

After 72 h, when A β O mediated neurodegeneration and glial activation is observed, a moderate STAT3 glial increased expression was evident. The predominant cell population consisted of astrocytes exhibiting nuclear activation.

Neurodegeneration persisted closely to glial activation in A β O rats on day 7, where STAT3 expression increased in glial cells with activated morphology; some of them displayed nuclear expression. Moreover, complementary immunofluorescence exposed nuclear STAT3 expression in neurons of the CA1 region. In contrast, cytoplasmic STAT3 neuronal expression was detected in control rats. This should be studied in the future due to its possible relevance in neuronal recovery after traumatic injury. Supposing, IL-6 trans-signaling in previous acute times, it would justify the high STAT3 astrocyte expression, mainly at day 7 after A β O administration. STAT3 expression remained 15 days after surgery correlating with high glial activation and neuronal death. Besides, the classical IL-6 signaling pathway could induce anti-inflammation and a proinflammatory response by trans-signaling; it has been recently studied because of its implication in neurodegenerative disorders, such as amyloid pathology in AD [68,69]. Cytoplasmic STAT3 expression disappeared on day 15 in controls, but A β O rats exhibited nuclear STAT3 expression in hypertrophic glial cells, correlating with persistent neuronal density reduction.

STAT3 is an important transcription factor activated by stimulation of several proinflammatory (IL-1, TNF α , IL-6) and anti-inflammatory (IL-10) molecular mediators. In the CNS, controversial functions of STAT3 has been reported, which could be due to a cell-specific response or the inflammatory microenvironment. For example, STAT3 has been involved in axon regeneration [70]. Besides, STAT3 activation could modulate synaptic plasticity trough induction of NMDAR-long term depression [71]. However, inflammation it has been recognized as an inductor of STAT3 derived from glial activation, which could promote different neuropathological processes, such as neurogenesis impairment and apoptosis [72].

Regarding apoptosis, STAT3 activation by proinflammatory cytokines enhances cytochrome C release and caspase activation [73]. In an epilepsy rat model, it is known that STAT3 is activated after status epilepticus. The administration of kainic acid significantly increases STAT3 levels linked to increased IL-1 production. The inhibition of STAT3 by WP1066 reduces IL-1 levels, Iba1 expression, and neuronal death that leads to the neurodegeneration observed [74]. With respect to microinjection of A β in animal models, the potential as STAT3 activator in neurons has been explored, favoring the transcription of genes linked to oxidative damage (as iNOS) that could be responsible for inducing apoptosis [28]. In our animal model, the expression of STAT3 is observed in acute times and correlated with the increase in neurodegeneration levels evidenced by FJB staining. We have considered that STAT3 increasing expression in A β O rats could mediate astrocyte [75] and microglial activation, as proposed previously [31]. Nuclear STAT3 localization in astrocytes and neurons could stimulate

different target genes related to inflammation and neurotoxicity. STAT3 activation was previously detected only in neurons and related to apoptosis [28].

To clarify the JAK2/STAT3 role, we designed an inhibition assay in rat primary hippocampal mixed culture, using a JAK2 (AG490) and a STAT3 specific inhibitor (Stattic). Cultures were exposed to a cytotoxic concentration of A β O for 72 h, a time that course with high neurodegeneration in the animal model. Both assays obtained results suggesting that low-moderate inhibition of the JAK2/STAT3 pathway decreased glial activation, which helped to prevent a neuron death promoted by A β O. However, when we tried to increase the inhibition state of STAT3, the results showed a reduced survival of neurons and astrocytes. The above pointed out that the JAK2/STAT3 pathway plays an essential role in A β O toxicity since it promotes the reactivity of astrocytes, which could secrete different inflammatory mediators that lead neurons to the neurodegeneration process.

In this sense, studies have consistently demonstrated the pathogenic JAK2/STAT3 pathway activation in glial cells is primed by the presence of aggregated A β . The JAK2 stimulation in AD transgenic mice (APP/PS1 or 3xtgAD) indicated that STAT3 activation promotes astrogliosis and synaptic dysfunction. Conversely, astrocyte-specific inhibition of the JAK2/STAT3 pathway in APP/PS1 mice control astrocyte reactivity restores synaptic deficits, and produces a A β deposition reduction, not linked to a microglial phagocytosis increase [30]. Moreover, a developing of an astrocyte conditional STAT3 knockout in APP/PS1 transgenic mice leads to an anti-inflammatory profile, which could mediate A β clearance by microglial cells and reduce cognitive decline [29]. Finally, another recent study in astrocyte primary culture exposed with A β O and treated with Stattic (1 μ M) showed that STAT3 is responsible for maintained reactive state of astrocytes, and dismisses changes in ERK and NF-kB. Also, the oral administration of this compound in the 5xFAD mice reduced the STAT3 activation in astrocytes, correlating with an improvement in cognitive function [76].

The JAK/STAT3 inhibition is a promising strategy to modulate glial reactivity to favor neuron survival under A β O insults. Nonetheless, as observed in our assays, high or total inhibition of the JAK2/STAT3 pathway could induce neurodegeneration due to its crucial role in cell proliferation, axon regeneration, and synaptic plasticity. Thus, the ideal strategy would be to modulate the pathway only in astrocytes, as stated by the previously mentioned experiments [29,30]. However, we know that one difference between our microinjection model and pathology, as AD is the constant A β aggregation, which induces a persistent inflammatory response and progressive neurodegeneration. Also, the recovery of A β O 30-day rats was partial compared to their respective control group, possibly related to the difference between STAT3 expression in both groups. The increased transcription factor expression and activation in A β O rats at day 30 could be favored by IL-6 and IL-10, two JAK/STAT3 inducers [77].

Future studies should clarify both cytokines' role in the dynamic of STAT3 activation, considering that both resulted increase on day 30. Another issue that should be explained is the possibility of density recovery due to the reduction of A β aggregates. If so, it would be interesting to evaluate the administration of a second A β O dose.

4. Materials and Methods

4.1. A β Oligomers

A β O were obtained from synthetic A β 1-42 peptide (AnaSpec San Jose, CA, USA AS-20276) using a method previously described [48]. The peptide was diluted with 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (Sigma-Aldrich Merck KGaA, Darmstadt, Germany H-8508) and incubated 1 h at room temperature followed by 15 min to 4 °C. The solvent was evaporated overnight, and the pellet was suspended in Dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich Merck KGaA, Darmstadt, Germany) to get a 5 mM solution. Finally, to obtain the oligomer forms aliquots of 100 μ M of the peptide were prepared with sterile phosphate-buffered saline 1 \times and incubated to 4 °C for 24 h. A simple transmission electron microscopy (TEM; FEI-TecnaBioTWIN, Hillsboro, OR, USA) analysis of 5 μ L of this solution was conducted to corroborate the presence of globular oligomers and the absence of fibrils. Also, low-molecular weight

oligomers (<17 KDa) were corroborated with western blot, using the A β antibody 6E10 (MAB1560, Chemicon, Merck Millipore, Massachusetts, USA) (data not shown).

4.2. Animal Model

Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) aged 12–14 weeks and 230–250 g of body weight were purchased from Bioinvert[®] bioterium, Estado de México, México (SENASICA AUT-B-A-1016-028). Animal experiments were conducted according the Official Mexican Norms (NOM-062-ZOO-1999 and NOM-033-SAG/ZOO-2014) and the Code of Practice for the Housing and Care of Animals Used in Scientific Procedures. Also, the experimental protocol (no. 113/09) was approved by the Ethics Committee of National Neurology and Neurosurgery Institute “Manuel Velasco Suárez” (April 2009).

Housing conditions were 22–24 °C of temperature, 50–60% humidity, 12/12 h light/dark cycle, water and food ad libitum. Rats were anesthetized with an intramuscular injection of xylazine (12 mg/kg) and ketamine (85 mg/kg), pain were managed with tramadol. A bilateral microinjection was performed in a stereotaxic surgery apparatus (Stoelting, Sheboygan, USA) in the coordinates corresponding to CA1 hippocampus region (*V*: -0.30 mm, *L*: \pm 0.25 mm y *AP*: -0.42 mm from bregma) [78]. The rate of infusion pump was 12 μ L/min and we used a 30 G dental needle, which was removed 5 min after the injection. In general, we create two study groups, the control group was injected with vehicle and the other group, conformed by rats microinjected with A β O. In each treatment we design a temporal study, considering subgroups of rats that was sacrificed in acute (18 and 72 h) and chronic (7, 15, and 30 days) times after surgery.

4.3. Immunohistochemistry and Immunofluorescence

Rats were anesthetized as previously mentioned and perfused with cold and sterile saline solution 0.9%, followed by 4% Phosphate-Buffered Paraformaldehyde. Brains were removed and stored for 1 week in a solution with 4% Phosphate-Buffered Paraformaldehyde and 4% of sucrose. Brain hemispheres were divided and dehydrated in gradual alcohols (70%, 96%, and 100%), followed by xylene treatment and paraffin embedded. 8 μ m-thick sagittal serial slices were obtained, and the slides were deparaffinized and hydrated. Antigen recovery was performed with 0.1 M citrate buffer, pH 6 and 0.2% Triton at 60 °C for 12 min. For IHC, endogenous peroxidase was inactivated with blocking reagent (Dako- Agilent Santa Clara, CA 95051 USA, S2003) for 10 min. Additionally, the tissue was incubated with bovine serum albumin (BSA) 2%-Triton 0.2% for 15 min. Slides were blocked with Background Sniper (Biocare Medical, California USA, BS966) for 15 min. Primary antibodies were diluted in BSA 1% and incubated at 4 °C overnight, followed by incubation Mach2 Universal HRP-Polymer Detection (Biocare Medical, California USA, M2U522) for 30 min. 3, 3'-diaminobenzidine (Dako K3468) was used for color developing. Slides were mounted and analyzed on a Leica DM LS microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). STAT-3 images were captured with the ScanScope CS digital processor (Aperio, San Diego, CA, USA).

Primary antibodies used for IHC were mouse monoclonal anti-NeuN (1:250, Millipore, MAB377), rabbit polyclonal anti-STAT3 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA, Sc-482).

After antigen retrieval in immunofluorescence, sections were permeabilized as we previously mentioned and blocked in 2% BSA for 30 min. Primary antibodies diluted in BSA 1% were incubated at 4 °C overnight, followed by secondary antibody incubation for 1 h at room temperature. In some cases, nuclei were stained with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen, D1306) for 5 min. Slides were mounted with Vectashield antifade mounting medium (Vector Laboratories, California, USA, H-1000).

Images were captured on a Leica TCS SP8 confocal microscope and processed with LAS AF software (Leica Microsystems). Primary antibodies used in IF were mouse monoclonal anti-NeuN (1:200, Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany MAB377), chicken polyclonal anti-GFAP (1:1000, Abcam, Cambridge UK, ab4674), rabbit polyclonal anti-GFAP (1:150, Genetex, California USA, GTX16997), rabbit polyclonal anti-Iba1 (1:300, Genetex, California USA, GTX100042), and anti-STAT3.

The secondary antibodies used were goat anti-chicken IgY Alexa Fluor 488 (1:300, Abcam, ab150173), goat anti-mouse IgG Cy5 (1:150, Zymed, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA, 816516), anti-rabbit IgG Alexa 555 (1:300, Cell Signaling, Massachusetts, USA, 4413S).

4.4. FluoroJade B Staining

FJB was used to stain brain cells under degeneration [79]. Tissue 8 μm -thick sections were deparaffinized and hydrated. Slides were incubated in 80% EtOH-1% NaOH for 5 min, followed by 2 min in 70% ethanol and 2 min in distilled water. Sections were immersed in 0.06% K_2MnO_4 for 20 min, after distilled water washes, slides were incubated at 4 °C overnight in 0.001% Fluoro-Jade B (Millipore, AG310) previously diluted in 0.1% acetic acid [80]. Slides were dried, immersed in xylene and mounted with Eco-Mount (Biocare Medical, EM897L). Images were captured at 40 \times magnification on a Leica DM LS microscope with epifluorescence (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

4.5. Quantification of NeuN and FluoroJade B

Mature neurons were identified with Anti-NeuN antibody in control and $\text{A}\beta\text{O}$ microinjected rats sacrificed on days 15 and 30 after stereotaxic surgery ($n = 4$, per group and time). For degenerated neurons, the FJB staining was evaluated in control and $\text{A}\beta\text{O}$ groups at 18 h, 72 h, and 7 days post-surgery ($n = 4$, per group and time).

Quantification of NeuN and FJB positive cells was realized with 8 μm -thick sagittal sections obtained from injury (2.5–2.7 mm lateral from bregma), one out every 10 sections was evaluated. Cell count was performed on the Leica Application Suite software version 4.0 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) on a 265 \times 365 μm frame at 40 \times magnification, analyzing 3 adjacent fields on CA1 region and the same for dentate gyrus. The experimental groups were blinded in during the count and we considered positive cells with whole cell bodies within the counting frame. Average of positive cells per mm^2 were reported [80,81].

4.6. Electron Microscopy

Rats were perfused with 4% Paraformaldehyde-2.5% Glutaraldehyde in 0.1 M phosphate-buffered saline (pH 7.4). Brains were removed and post-fixed in the same solution for 24 h. Tissues were processed in a LEICA EM TP (Leica Microsystems, Vienna, Austria) and embedded in Epon resin (EMbed 812 Electron Microscopy Science, Kolkata, India, Cat. No.14120). A 90 nm slices were obtained, mounted in 200 mesh copper grids, and contrasted with 2% uranyl acetate and lead citrate. Images were captured on a TEM (FEI-TecnaBioTWIN, Hillsboro, OR, USA) [82,83].

4.7. Cytokines Quantification

Rat hippocampus for each subgroup of study ($n = 4$, for each time and treatment evaluated) was dissected and homogenized in sterile phosphate-buffered saline containing 0.01% Triton X-100 and protease inhibitors (Sigma, P8340) [84], using the Sample Grinding Kit (Amersham Bioscience, Merck KGaA, Darmstadt, Germany cat. no. 80-6483-37) and Vibra-Cell™ Ultrasonic Liquid Processors (Sonics & Materials Inc., Connecticut, USA, Cat. No. VCX13). Samples were centrifuged at 1000 g and 4 °C for 10 min, to assure remaining debris remove, the resulted supernatant was centrifuged at 20,000 g for 40 min at 4 °C [85]. The cytokines IL-6, IL-10, and IL-1 β were quantified by an Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) using the MILLIPLEX® MAP Rat Cytokine/Chemokine magnetic bead panel kit (Millipore), according to the supplier's protocol (RECYTMAG-65K-03; Millipore, Temecula, CA, USA). The panel kit was reading with the LUMINEX MAGPIX® detection system with xPONET® software and the results were analyzed in MILLIPLEX® Analyst version 5.1 (Millipore, Billerica, MA, USA). The cytokines sensitivity ranges were 2.4–10,000 pg/mL for IL-1 β , 73.2–300,000 pg/mL for IL-6, and 7.3–30,000 pg/mL for IL-10.

4.8. RT-PCR

Total RNA was isolated from rat hippocampus ($n = 4$, for each time and treatment evaluated) with TRIzol[®] reagent, considering the supplier's protocol (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA, cat. no.15596026). cDNA was synthesized from 500 ng of total RNA using AMPIGENE[®] cDNA Synthesis kit (Enzo Life Sciences, ENZ-KIT106). The reverse-transcribed product was diluted five times and 2.0 μ L of cDNA was mixed with 2 \times TaqMan Master Mix and 0.5 μ L of 20 \times Gene Expression Assay, the reaction was conducted in 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The TaqMan[®] gene-specific probes (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) selected in this work were IL-6 (cat. no. Rn01410330_m1) and β -actin (cat. no. Rn00667869_m1). The $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method was used to analyze the relative target gene expression respect the β -actin gene expression [86].

4.9. STAT3 Inhibition Assay in Cell Model

Primary mixed hippocampal cultures were obtained from 2–4 day old Wistar rats, with slight modifications to the method described previously by Osorio et al [87]. After 15 days of culture, a STAT3 inhibition assay was conducted. We used the small molecule Stattic (Santa Cruz Biotechnology, California, USA, Sc-202818) at different dilutions (5, 10, and 20 μ M). Cultures were exposed to different treatments vehicle (DMSO), Stattic (5 μ M), A β O (20 μ M) or Stattic+A β O. We also realize two independent experiments using AG490 (Calbiochem, San Diego, CA, USA), a JAK2 inhibitor (25 μ M and 50 μ M). The inhibitors were added one day before A β O. After 72 h, cells were fixed with 4% Phosphate-Buffered Paraformaldehyde and immunofluorescence was performed with the next primary antibodies: mouse monoclonal anti-MAP2 (1:300, Millipore, MAB3418), mouse monoclonal anti-NeuN, rabbit polyclonal anti-STAT3 (1:100 Novus, NBP2-67432), chicken polyclonal anti-GFAP. Secondary antibodies were goat anti-chicken IgY Alexa Fluor 488, Goat Anti-Mouse IgG Cy5, goat anti-rabbit IgG Alexa 555 (1:300, Abcam, ab150086).

4.10. Statistics

Data were analyzed with MiniTab[®] v. 19 software (State College, PA, USA), using a significance level (α) of 0.05. Before any statistical analysis, equality of variances was assessed by Levene's test.

Differences between five evaluated times for each treatment (SS or A β) were identified with a one-way ANOVA test and by specific comparisons. Subsequently, to determine statistical significance between the different study groups (SS versus A β) at equivalent time intervals, a *t*-test was conducted. The integrated density of total STAT3 was calculated in Fiji software (Fiji, ImageJ, Wayne Rasband National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) [88].

5. Conclusions

The temporal study of A β O rat intrahippocampal microinjection suggested, oligomers mediate indirect neurotoxicity and neurodegeneration through glial activation and the consequent inflammatory response. Based on our present results, A β O induces the JAK/STAT3 pathway stimulation in astrocytes promoting it activation state and in neurons favor surveillance. However, the constant activation of the pathway by A β O, leads to hypertrophic astrocytes, which may promote an inflammatory microenvironment and increased neurodegeneration. A therapy of JAK/STAT3 pathway inhibition, mainly directed to regulate astrocytes reactivity, could be an excellent strategy to diminish neuron death and cognitive decline in AD. The use of JAK/STAT3 inhibitors should be considered with caution because a high dosage would favor the neuronal death in addition to the generated by A β aggregates. Considering the direct relationship between inflammation and neurodegeneration at short times, it would be useful to try different drugs that modulate astrocyte activation states. The challenge is to probe if the return to a quiescent state could improve other A β O toxic effects such as mitochondrial dysfunction, LTP impairment, oxidative damage, membrane pore formation, neurogenesis, and plasticity impairments.

Author Contributions: D.T.-R. performed the experiments, proposed some of them, and wrote the paper. G.P.-L. captured confocal microscopy of cell culture inhibition assays. F.B.-P. supported D.T.-R. in some animal experiments. I.L.-R. provided funding for the project, reviewed the manuscript, and participated in the final evaluation. J.C.L.-C. processed samples for the electron microscopy and managed the microscope, which was provided by R.H.-P. A.R.-C. performed data static analysis. G.G.-L. and R.G. standardized and supervised cell primary hippocampal cultures, and assisted in cell culture experiments. I.S.-C. provided the AG490 inhibitor and supported the use of this inhibitor in cell culture. B.F.-G. was the D.T.-R. supervisor and provided the confocal microscope of the animal model. V.C.-P. was the corresponding author, designed the experiments, edited the paper, and contributed reagents and materials. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript

Funding: CONACYT S0008-2016-1 no. 273182. DTR received a Ph.D. funding provided by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (funding no. 254288, CVU 370086).

Acknowledgments: Gonzalo Acero-Galindo for his technical support in A β O preparation.

Conflicts of Interest: The authors declare that there are no conflict of interest regarding the publication of this paper.

Abbreviations

A β O	Amyloid β oligomeric
JAK-STAT3	Janus kinase–signal transducer and activator of transcription 3
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
IL-6	Interleukin 6
IL-10	Interleukin 10
AD	Alzheimer’s disease
NP	Neuritic Plaques
A β	Amyloid beta
A β 40	Amyloid β 1-40
A β 42	Amyloid β 1-42
A β PP	Amyloid β precursor protein
NMDAR	N-methyl-D-aspartic acid
IL-1 β	Interleukin 1 beta
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
STAT	Signal transducer and activator of transcription
JAK	Janus kinase
JAK2	Janus kinase 2
FJB	Fluoro-Jade B
DG	Dentate gyrus
NeuN	Neuronal nuclei protein
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
IBA1	Ionized calcium binding adaptor molecule 1
SS or S	Saline solution
Mt	Mitochondria
Ax	Axon
F	Fibril
M	Microglia
N	Neuron
A	Astrocyte
SEM	Standard error of the mean
Er	Endoplasmic reticulum
v	Vacuole
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
IHC	Immunohistochemistry
BACE1	β -secretase 1
ApoE	Apolipoprotein E
JAK2-STAT3	Janus kinase 2 -Signal transducer and activator of transcription 3
3xtgAD	Triple transgenic Alzheimer disease mice
BSA	Bovine serum albumin
CNSICV	Central nervous systemIntracerebroventricular

Appendix A

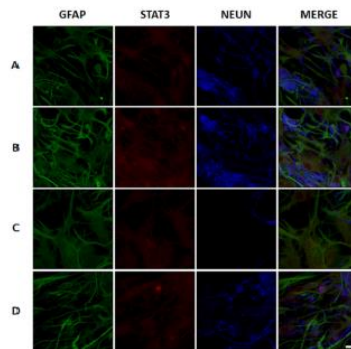


Figure A1. AG490 (25 μM) inhibition assay. Immunofluorescence representative 40 \times images (scale bar 40 \times images = 40 μm) of inhibition assay in primary hippocampal cultures, after 72 h of exposition to (A) Vehicle, (B) AG490 25 μM , (C) A β O 20 μM , and (D) AG490+A β O. Total STAT3 expression (Alexa 555), astrocytes with GFAP (Alexa 488), and neurons with NeuN (Cy5) were monitored. Although AG490 did not promote evident changes in STAT3 expression, it seems to prevent neuron loss in cultures exposed to A β O.

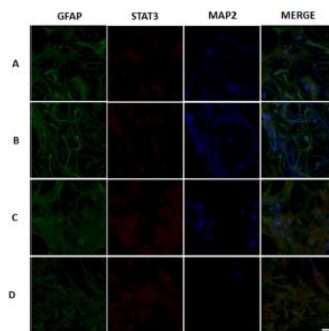


Figure A2. AG490 inhibition assay (50 μM). Immunofluorescence representative 40 \times images (scale bar 40 \times images = 40 μm) of inhibition assay in primary hippocampal cultures, after 72 h of exposition to (A) Vehicle, (B) AG490 50 μM , (C) A β O 20 μM , and (D) AG490+A β O. Total STAT3 expression (Alexa 555), astrocytes with GFAP (Alexa 488), and neurons with MAP2 (Cy5) were identified. The use of AG490 at 50 μM decreased the number of astrocytes and the neuron viability.

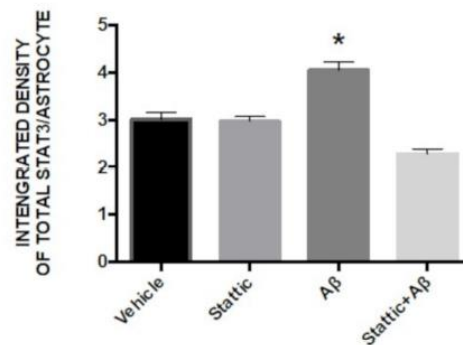


Figure A3. Integrated density of Total STAT3 immunoreactivity/astrocytes. Data are means \pm SEM ($n = 4$, 4 astrocytes). One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test (* $p < 0.05$).

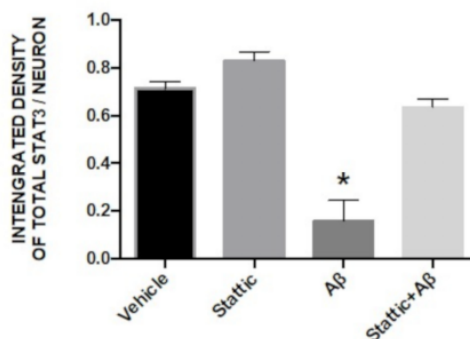


Figure A4. Integrated density of Total STAT3 immunoreactivity/neurons. Data are means \pm SEM ($n = 4$, 3 neurons). One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test (* $p < 0.05$).

References

- Selkoe, D.J.; Hardy, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* **2016**, *8*, 595–608. [[CrossRef](#)]
- Kametani, F.; Hasegawa, M. Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci.* **2018**, *12*, 25. [[CrossRef](#)]
- Hardy, J.A.; Higgins, G.A. Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science* **1992**, *256*, 184–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Haass, C.; Kaether, C.; Thinakaran, G.; Sisodia, S. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2012**, *2*, a006270. [[CrossRef](#)]
- Hartmann, T.; Bieger, S.C.; Bruhl, B.; Tienari, P.J.; Ida, N.; Allsop, D.; Roberts, G.W.; Masters, C.L.; Dotti, C.G.; Unsicker, K.; et al. Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. *Nat. Med.* **1997**, *3*, 1016–1020. [[CrossRef](#)]
- Pasternak, S.H.; Callahan, J.W.; Mahuran, D.J. The role of the endosomal/lysosomal system in amyloid-beta production and the pathophysiology of Alzheimer's disease: Reexamining the spatial paradox from a lysosomal perspective. *J. Alzheimers Dis.* **2004**, *6*, 53–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Iwatsubo, T.; Odaka, A.; Suzuki, N.; Mizusawa, H.; Nukina, N.; Ihara, Y. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: Evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* **1994**, *13*, 45–53. [[CrossRef](#)]
- Gu, L.; Guo, Z. Alzheimer's A beta42 and A beta40 peptides form interlaced amyloid fibrils. *J. Neurochem.* **2013**, *126*, 305–311. [[CrossRef](#)]
- Urbanc, B.; Cruz, L.; Le, R.; Sanders, J.; Ashe, K.H.; Duff, K.; Stanley, H.E.; Irizarry, M.C.; Hyman, B.T. Neurotoxic effects of thioflavin S-positive amyloid deposits in transgenic mice and Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 13990–13995. [[CrossRef](#)]
- Knowles, R.B.; Gomez-Isla, T.; Hyman, B.T. A beta associated neuropil changes: Correlation with neuronal loss and dementia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1998**, *57*, 1122–1130. [[CrossRef](#)]
- Sengupta, U.; Nilson, A.N.; Kaye, R. The Role of Amyloid-beta Oligomers in Toxicity, Propagation, and Immunotherapy. *EBioMedicine* **2016**, *6*, 42–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Yasumoto, T.; Takamura, Y.; Tsuji, M.; Watanabe-Nakayama, T.; Imamura, K.; Inoue, H.; Nakamura, S.; Inoue, T.; Kimura, A.; Yano, S.; et al. High molecular weight amyloid beta1-42 oligomers induce neurotoxicity via plasma membrane damage. *FASEB J.* **2019**, *33*, 9220–9234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ono, K. Alzheimer's disease as oligomeropathy. *Neurochem. Int.* **2018**, *119*, 57–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sakono, M.; Zako, T. Amyloid oligomers: Formation and toxicity of A beta oligomers. *FEBS J.* **2010**, *277*, 1348–1358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Alberdi, E.; Sanchez-Gomez, M.V.; Cavaliere, F.; Perez-Samartin, A.; Zugaza, J.L.; Trullas, R.; Domercq, M.; Matute, C. Amyloid beta oligomers induce Ca²⁺ dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors. *Cell Calcium* **2010**, *47*, 264–272. [[CrossRef](#)]

16. Serra-Batiste, M.; Ninot-Pedrosa, M.; Bayoumi, M.; Gairi, M.; Maglia, G.; Carulla, N. Abeta42 assembles into specific beta-barrel pore-forming oligomers in membrane-mimicking environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 10866–10871. [[CrossRef](#)]
17. Meraz-Rios, M.A.; Toral-Rios, D.; Franco-Bocanegra, D.; Villeda-Hernandez, J.; Campos-Pena, V. Inflammatory process in Alzheimer's Disease. *Front. Integr. Neurosci.* **2013**, *7*, 59. [[CrossRef](#)]
18. Pan, X.D.; Zhu, Y.G.; Lin, N.; Zhang, J.; Ye, Q.Y.; Huang, H.P.; Chen, X.C. Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid is attenuated by oligomeric beta-amyloid: Implications for Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* **2011**, *6*, 45. [[CrossRef](#)]
19. Minter, M.R.; Taylor, J.M.; Crack, P.J. The contribution of neuroinflammation to amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **2016**, *136*, 457–474. [[CrossRef](#)]
20. Garwood, C.J.; Pooler, A.M.; Atherton, J.; Hanger, D.P.; Noble, W. Astrocytes are important mediators of Abeta-induced neurotoxicity and tau phosphorylation in primary culture. *Cell Death Dis.* **2011**, *2*, e167. [[CrossRef](#)]
21. Narayan, P.; Holmstrom, K.M.; Kim, D.H.; Whitcomb, D.J.; Wilson, M.R.; St George-Hyslop, P.; Wood, N.W.; Dobson, C.M.; Cho, K.; Abramov, A.Y.; et al. Rare individual amyloid-beta oligomers act on astrocytes to initiate neuronal damage. *Biochemistry* **2014**, *53*, 2442–2453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Rajendran, L.; Paolicelli, R.C. Microglia-Mediated Synapse Loss in Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* **2018**, *38*, 2911–2919. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Bulic, B.; Pickhardt, M.; Mandelkow, E. Progress and developments in tau aggregation inhibitors for Alzheimer disease. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 4135–4155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Parajuli, B.; Sonobe, Y.; Horiuchi, H.; Takeuchi, H.; Mizuno, T.; Suzumura, A. Oligomeric amyloid beta induces IL-1beta processing via production of ROS: Implication in Alzheimer's disease. *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, e975. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Sondag, C.M.; Dhawan, G.; Combs, C.K. Beta amyloid oligomers and fibrils stimulate differential activation of primary microglia. *J. Neuroinflamm.* **2009**, *6*, 1. [[CrossRef](#)]
26. White, J.A.; Manelli, A.M.; Holmberg, K.H.; Van Eldik, L.J.; Ladu, M.J. Differential effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta 1-42 on astrocyte-mediated inflammation. *Neurobiol. Dis.* **2005**, *18*, 459–465. [[CrossRef](#)]
27. Cheon, H.; Yang, J.; Stark, G.R. The functions of signal transducers and activators of transcriptions 1 and 3 as cytokine-inducible proteins. *J. Interferon. Cytokine Res.* **2011**, *31*, 33–40. [[CrossRef](#)]
28. Wan, J.; Fu, A.K.; Ip, F.C.; Ng, H.K.; Hugon, J.; Page, G.; Wang, J.H.; Lai, K.O.; Wu, Z.; Ip, N.Y. Tyk2/STAT3 signaling mediates beta-amyloid-induced neuronal cell death: Implications in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 6873–6881. [[CrossRef](#)]
29. Reichenbach, N.; Delekate, A.; Plescher, M.; Schmitt, F.; Krauss, S.; Blank, N.; Halle, A.; Petzold, G.C. Inhibition of Stat3-mediated astrogliosis ameliorates pathology in an Alzheimer's disease model. *EMBO Mol. Med.* **2019**, *11*. [[CrossRef](#)]
30. Ceyzeriat, K.; Ben Haim, L.; Denizot, A.; Pommier, D.; Matos, M.; Guillemaud, O.; Palomares, M.A.; Abjean, L.; Petit, F.; Gipchtein, P.; et al. Modulation of astrocyte reactivity improves functional deficits in mouse models of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. Commun.* **2018**, *6*, 104. [[CrossRef](#)]
31. Eufemi, M.; Cocchiola, R.; Romaniello, D.; Correani, V.; Di Francesco, L.; Fabrizi, C.; Maras, B.; Schinina, M.E. Acetylation and phosphorylation of STAT3 are involved in the responsiveness of microglia to beta amyloid. *Neurochem. Int.* **2015**, *81*, 48–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Gutierrez, R.; Armand, V.; Schuchmann, S.; Heinemann, U. Epileptiform activity induced by low Mg²⁺ in cultured rat hippocampal slices. *Brain Res.* **1999**, *815*, 294–303. [[CrossRef](#)]
33. Schust, J.; Sperl, B.; Hollis, A.; Mayer, T.U.; Berg, T. Stattic: A small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization. *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 1235–1242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. DaRocha-Souto, B.; Scotton, T.C.; Coma, M.; Serrano-Pozo, A.; Hashimoto, T.; Sereno, L.; Rodriguez, M.; Sanchez, B.; Hyman, B.T.; Gomez-Isla, T. Brain oligomeric beta-amyloid but not total amyloid plaque burden correlates with neuronal loss and astrocyte inflammatory response in amyloid precursor protein/tau transgenic mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2011**, *70*, 360–376. [[CrossRef](#)]
35. Kasza, A.; Penke, B.; Frank, Z.; Bozso, Z.; Szegedi, V.; Hunya, A.; Nemeth, K.; Kozma, G.; Fulop, L. Studies for Improving a Rat Model of Alzheimer's Disease: Icv Administration of Well-Characterized beta-Amyloid 1-42 Oligomers Induce Dysfunction in Spatial Memory. *Molecules* **2017**, *22*, 2007. [[CrossRef](#)]

36. Zhang, L.; Dong, S.; Zhao, G.; Ma, Y. 7.0T nuclear magnetic resonance evaluation of the amyloid beta (1–40) animal model of Alzheimer’s disease: Comparison of cytology verification. *Neural Regen. Res.* **2014**, *9*, 430–435. [[CrossRef](#)]
37. Karthick, C.; Nithiyandan, S.; Essa, M.M.; Guillemin, G.J.; Jayachandran, S.K.; Anusuyadevi, M. Time-dependent effect of oligomeric amyloid-beta (1–42)-induced hippocampal neurodegeneration in rat model of Alzheimer’s disease. *Neurol. Res.* **2019**, *41*, 139–150. [[CrossRef](#)]
38. Perez, J.L.; Carrero, I.; Gonzalo, P.; Arevalo-Serrano, J.; Sanz-Anquela, J.M.; Ortega, J.; Rodriguez, M.; Gonzalo-Ruiz, A. Soluble oligomeric forms of beta-amyloid (Abeta) peptide stimulate Abeta production via astrogliosis in the rat brain. *Exp. Neurol.* **2010**, *223*, 410–421. [[CrossRef](#)]
39. Forny-Germano, L.; Lyra e Silva, N.M.; Batista, A.F.; Brito-Moreira, J.; Gralle, M.; Boehnke, S.E.; Coe, B.C.; Lablans, A.; Marques, S.A.; Martinez, A.M.; et al. Alzheimer’s disease-like pathology induced by amyloid-beta oligomers in nonhuman primates. *J. Neurosci.* **2014**, *34*, 13629–13643. [[CrossRef](#)]
40. Carrero, I.; Gonzalo, M.R.; Martin, B.; Sanz-Anquela, J.M.; Arevalo-Serrano, J.; Gonzalo-Ruiz, A. Oligomers of beta-amyloid protein (Abeta1-42) induce the activation of cyclooxygenase-2 in astrocytes via an interaction with interleukin-1beta, tumour necrosis factor-alpha, and a nuclear factor kappa-B mechanism in the rat brain. *Exp. Neurol.* **2012**, *236*, 215–227. [[CrossRef](#)]
41. Gonzalo-Ruiz, A.; Delso, M.; Carrero, I.; Gonzalo Vicente, P.; Sanz-Anquela, J.M.; Rodríguez, M.; Arevalo-Serrano, J. A rat model of oligomeric forms of beta-amyloid (A β) peptide: Neuronal loss, synaptic alteration, astrogliosis, and calcium-binding proteins activation in vivo. *Eur. J. Anat.* **2011**, *15*, 47–72.
42. Brouillette, J.; Caillierez, R.; Zommer, N.; Alves-Pires, C.; Benilova, I.; Blum, D.; De Strooper, B.; Buee, L. Neurotoxicity and memory deficits induced by soluble low-molecular-weight amyloid-beta1-42 oligomers are revealed in vivo by using a novel animal model. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 7852–7861. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Faucher, P.; Mons, N.; Micheau, J.; Louis, C.; Beracochea, D.J. Hippocampal Injections of Oligomeric Amyloid beta-peptide (1-42) Induce Selective Working Memory Deficits and Long-lasting Alterations of ERK Signaling Pathway. *Front. Aging Neurosci.* **2015**, *7*, 245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Chafekar, S.M.; Baas, F.; Scheper, W. Oligomer-specific Abeta toxicity in cell models is mediated by selective uptake. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1782*, 523–531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Umeda, T.; Ramser, E.M.; Yamashita, M.; Nakajima, K.; Mori, H.; Silverman, M.A.; Tomiyama, T. Intracellular amyloid beta oligomers impair organelle transport and induce dendritic spine loss in primary neurons. *Acta Neuropathol. Commun.* **2015**, *3*, 51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Wang, W.; Hou, T.T.; Jia, L.F.; Wu, Q.Q.; Quan, M.N.; Jia, J.P. Toxic amyloid-beta oligomers induced self-replication in astrocytes triggering neuronal injury. *EBioMedicine* **2019**, *42*, 174–187. [[CrossRef](#)]
47. Maezawa, I.; Zimin, P.I.; Wulff, H.; Jin, L.W. Amyloid-beta protein oligomer at low nanomolar concentrations activates microglia and induces microglial neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 3693–3706. [[CrossRef](#)]
48. Klein, W.L. Abeta toxicity in Alzheimer’s disease: Globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem. Int.* **2002**, *41*, 345–352. [[CrossRef](#)]
49. Ono, K.; Condrion, M.M.; Teplow, D.B. Structure-neurotoxicity relationships of amyloid beta-protein oligomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 14745–14750. [[CrossRef](#)]
50. Pujol-Pina, R.; Vilaprinyo-Pascual, S.; Mazzucato, R.; Arcella, A.; Vilaseca, M.; Orozco, M.; Carulla, N. SDS-PAGE analysis of Abeta oligomers is disserving research into Alzheimer s disease: Appealing for ESI-IM-MS. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 14809. [[CrossRef](#)]
51. Zhao, J.; O’Connor, T.; Vassar, R. The contribution of activated astrocytes to Abeta production: Implications for Alzheimer’s disease pathogenesis. *J. Neuroinflamm.* **2011**, *8*, 150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Cho, H.J.; Kim, S.K.; Jin, S.M.; Hwang, E.M.; Kim, Y.S.; Huh, K.; Mook-Jung, I. IFN-gamma-induced BACE1 expression is mediated by activation of JAK2 and ERK1/2 signaling pathways and direct binding of STAT1 to BACE1 promoter in astrocytes. *Glia* **2007**, *55*, 253–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Arrazola, M.S.; Ramos-Fernandez, E.; Cisternas, P.; Ordenes, D.; Inestrosa, N.C. Wnt Signaling Prevents the Abeta Oligomer-Induced Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening Preserving Mitochondrial Structure in Hippocampal Neurons. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0168840. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Kim, M.J.H.; Huh, Y.H.; Choi, K.J.; Jun, S.; Je, A.R.; Chae, H.; Lee, C.; Kweon, H.S. Ultrastructural Abnormalities in APP/PSEN1 Transgenic Mouse Brain as the Alzheimer’s Disease Model. *Appl. Microsc.* **2012**, *42*, 179–185. [[CrossRef](#)]

55. Komleva, Y.K.; Lopatina, O.L.; Gorina, Y.V.; Chernykh, A.I.; Shuvaev, A.N.; Salmina, A.B. Early changes in hippocampal neurogenesis induced by soluble Ab1-42 oligomers. *Biomed. Khim.* **2018**, *64*, 326–333. [[CrossRef](#)]
56. Chakrabarty, P.; Li, A.; Ceballos-Diaz, C.; Eddy, J.A.; Funk, C.C.; Moore, B.; DiNunno, N.; Rosario, A.M.; Cruz, P.E.; Verbeeck, C.; et al. IL-10 alters immunoproteostasis in APP mice, increasing plaque burden and worsening cognitive behavior. *Neuron* **2015**, *85*, 519–533. [[CrossRef](#)]
57. Shaftel, S.S.; Kyrkanides, S.; Olschowka, J.A.; Miller, J.N.; Johnson, R.E.; O'Banion, M.K. Sustained hippocampal IL-1 beta overexpression mediates chronic neuroinflammation and ameliorates Alzheimer plaque pathology. *J. Clin. Investig.* **2007**, *117*, 1595–1604. [[CrossRef](#)]
58. Chakrabarty, P.; Jansen-West, K.; Beccard, A.; Ceballos-Diaz, C.; Levites, Y.; Verbeeck, C.; Zubair, A.C.; Dickson, D.; Golde, T.E.; Das, P. Massive gliosis induced by interleukin-6 suppresses Abeta deposition in vivo: Evidence against inflammation as a driving force for amyloid deposition. *FASEB J.* **2010**, *24*, 548–559. [[CrossRef](#)]
59. Craft, J.M.; Watterson, D.M.; Hirsch, E.; Van Eldik, L.J. Interleukin 1 receptor antagonist knockout mice show enhanced microglial activation and neuronal damage induced by intracerebroventricular infusion of human beta-amyloid. *J. Neuroinflammation* **2005**, *2*, 15. [[CrossRef](#)]
60. Ghosh, S.; Wu, M.D.; Shaftel, S.S.; Kyrkanides, S.; LaFerla, F.M.; Olschowka, J.A.; O'Banion, M.K. Sustained interleukin-1beta overexpression exacerbates tau pathology despite reduced amyloid burden in an Alzheimer's mouse model. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 5053–5064. [[CrossRef](#)]
61. Qiu, Z.; Gruol, D.L. Interleukin-6, beta-amyloid peptide and NMDA interactions in rat cortical neurons. *J. Neuroimmunol.* **2003**, *139*, 51–57. [[CrossRef](#)]
62. Lobo-Silva, D.; Carriche, G.M.; Castro, A.G.; Roque, S.; Saraiva, M. Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation. *J. Neuroinflamm.* **2016**, *13*, 297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Guillot-Sestier, M.V.; Doty, K.R.; Gate, D.; Rodriguez, J., Jr.; Leung, B.P.; Rezai-Zadeh, K.; Town, T. IL10 deficiency rebalances innate immunity to mitigate Alzheimer-like pathology. *Neuron* **2015**, *85*, 534–548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Taipa, R.; das Neves, S.P.; Sousa, A.L.; Fernandes, J.; Pinto, C.; Correia, A.P.; Santos, E.; Pinto, P.S.; Carneiro, P.; Costa, P.; et al. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in the CSF of patients with Alzheimer's disease and their correlation with cognitive decline. *Neurobiol. Aging* **2019**, *76*, 125–132. [[CrossRef](#)]
65. Amsen, D.; de Visser, K.E.; Town, T. Approaches to determine expression of inflammatory cytokines. *Methods Mol. Biol.* **2009**, *511*, 107–142. [[CrossRef](#)]
66. Stenken, J.A.; Poschenrieder, A.J. Bioanalytical chemistry of cytokines—A review. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *853*, 95–115. [[CrossRef](#)]
67. Mertens, C.; Darnell, J.E., Jr. SnapShot: JAK-STAT signaling. *Cell* **2007**, *131*, 612. [[CrossRef](#)]
68. Rothaug, M.; Becker-Pauly, C.; Rose-John, S. The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, *1863*, 1218–1227. [[CrossRef](#)]
69. Escrig, A.; Canal, C.; Sanchis, P.; Fernandez-Gayol, O.; Montilla, A.; Comes, G.; Molinero, A.; Giral, M.; Gimenez-Llort, L.; Becker-Pauly, C.; et al. IL-6 trans-signaling in the brain influences the behavioral and physio-pathological phenotype of the Tg2576 and 3xTgAD mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Behav. Immun.* **2019**. [[CrossRef](#)]
70. Mehta, S.T.; Luo, X.; Park, K.K.; Bixby, J.L.; Lemmon, V.P. Hyperactivated Stat3 boosts axon regeneration in the CNS. *Exp. Neurol.* **2016**, *280*, 115–120. [[CrossRef](#)]
71. Nicolas, C.S.; Peineau, S.; Amici, M.; Csaba, Z.; Fafouri, A.; Javalet, C.; Collett, V.J.; Hildebrandt, L.; Seaton, G.; Choi, S.L.; et al. The Jak/STAT pathway is involved in synaptic plasticity. *Neuron* **2012**, *73*, 374–390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Chen, E.; Xu, D.; Lan, X.; Jia, B.; Sun, L.; Zheng, J.C.; Peng, H. A novel role of the STAT3 pathway in brain inflammation-induced human neural progenitor cell differentiation. *Curr. Mol. Med.* **2013**, *13*, 1474–1484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Dedoni, S.; Olianias, M.C.; Onali, P. Interferon-beta induces apoptosis in human SH-SY5Y neuroblastoma cells through activation of JAK-STAT signaling and down-regulation of PI3K/Akt pathway. *J. Neurochem.* **2010**, *115*, 1421–1433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

74. Tian, D.S.; Peng, J.; Murugan, M.; Feng, L.J.; Liu, J.L.; Eyo, U.B.; Zhou, L.J.; Mogilevsky, R.; Wang, W.; Wu, L.J. Chemokine CCL2-CCR2 Signaling Induces Neuronal Cell Death via STAT3 Activation and IL-1beta Production after Status Epilepticus. *J. Neurosci.* **2017**, *37*, 7878–7892. [[CrossRef](#)]
75. O'Callaghan, J.P.; Kelly, K.A.; VanGilder, R.L.; Sofroniew, M.V.; Miller, D.B. Early activation of STAT3 regulates reactive astrogliosis induced by diverse forms of neurotoxicity. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e102003. [[CrossRef](#)]
76. Choi, M.; Kim, H.; Yang, E.J.; Kim, H.S. Inhibition of STAT3 phosphorylation attenuates impairments in learning and memory in 5XFAD mice, an animal model of Alzheimer's disease. *J. Pharmacol. Sci.* **2020**. [[CrossRef](#)]
77. Niemand, C.; Nimmesgern, A.; Haan, S.; Fischer, P.; Schaper, F.; Rossaint, R.; Heinrich, P.C.; Muller-Newen, G. Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3. *J. Immunol.* **2003**, *170*, 3263–3272. [[CrossRef](#)]
78. Paxinos, G.; Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4th ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 1998.
79. Schmued, L.C.; Hopkins, K.J. Fluoro-Jade B: A high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res.* **2000**, *874*, 123–130. [[CrossRef](#)]
80. Liu, F.; Schafer, D.P.; McCullough, L.D. TTC, fluoro-Jade B and NeuN staining confirm evolving phases of infarction induced by middle cerebral artery occlusion. *J. Neurosci. Methods* **2009**, *179*, 1–8. [[CrossRef](#)]
81. do Nascimento, A.L.; Dos Santos, N.F.; Campos Pelagio, F.; Aparecida Teixeira, S.; de Moraes Ferrari, E.A.; Langone, F. Neuronal degeneration and gliosis time-course in the mouse hippocampal formation after pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res.* **2012**, *1470*, 98–110. [[CrossRef](#)]
82. Zhvania, M.G.; Ksovreli, M.; Japaridze, N.J.; Lordkipanidze, T.G. Ultrastructural changes to rat hippocampus in pentylenetetrazol- and kainic acid-induced status epilepticus: A study using electron microscopy. *Micron* **2015**, *74*, 22–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Zueva, L.; Rivera, Y.; Kucheryavykh, L.; Skatchkov, S.N.; Eaton, M.J.; Sanabria, P.; Inyushin, M. Electron microscopy in rat brain slices reveals rapid accumulation of Cisplatin on ribosomes and other cellular components only in glia. *Chemother. Res. Pract.* **2014**, *2014*, 174039. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Nava, P.; Koch, S.; Laukoetter, M.G.; Lee, W.Y.; Kolegraff, K.; Capaldo, C.T.; Beeman, N.; Addis, C.; Gerner-Smidt, K.; Neumaier, I.; et al. Interferon-gamma regulates intestinal epithelial homeostasis through converging beta-catenin signaling pathways. *Immunity* **2010**, *32*, 392–402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Nadella, R.; Voutilainen, M.H.; Saarma, M.; Gonzalez-Barrios, J.A.; Leon-Chavez, B.A.; Jimenez, J.M.; Jimenez, S.H.; Escobedo, L.; Martinez-Fong, D. Transient transfection of human CDNF gene reduces the 6-hydroxydopamine-induced neuroinflammation in the rat substantia nigra. *J. Neuroinflamm.* **2014**, *11*, 209. [[CrossRef](#)]
86. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)]
87. Osorio, B.; Leon, U.; Galvan, E.J.; Gutierrez, R. Cocultures of GFP(+) -granule cells with GFP(-) -pyramidal cells and interneurons for the study of mossy fiber neurotransmission with paired recordings. *Hippocampus* **2013**, *23*, 247–252. [[CrossRef](#)]
88. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682. [[CrossRef](#)]





GSK3 β and Tau Protein in Alzheimer's Disease and Epilepsy

Danira Toral-Rios¹, Pavel S. Pichardo-Rojas², Mario Alonso-Vanegas³
 and Victoria Campos-Peña^{4*}

¹Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Mexico City, Mexico, ²Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Mexico, ³Centro Internacional de Cirugía de Epilepsia, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, HMG, Hospital Coyoacán, Mexico City, Mexico, ⁴Laboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Mexico City, Mexico

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia present in older adults; its etiology involves genetic and environmental factors. In recent years, epidemiological studies have shown a correlation between AD and chronic epilepsy since a considerable number of patients with AD may present seizures later on. Although the pathophysiology of seizures in AD is not completely understood, it could represent the result of several molecular mechanisms linked to amyloid beta-peptide (A β) accumulation and the hyperphosphorylation of tau protein, which may induce an imbalance in the release and recapture of excitatory and inhibitory neurotransmitters, structural alterations of the neuronal cytoskeleton, synaptic loss, and neuroinflammation. These changes could favor the recurrent development of hypersynchronous discharges and epileptogenesis, which, in a chronic state, favor the neurodegenerative process and influence the cognitive decline observed in AD. Supporting this correlation, histopathological studies in the brain tissue of temporal lobe epilepsy (TLE) patients have revealed the presence of A β deposits and the accumulation of tau protein in the neurofibrillary tangles (NFTs), accompanied by an increase of glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3 β) activity that may lead to an imminent alteration in posttranslational modifications of some microtubule-associated proteins (MAPs), mainly tau. The present review is focused on understanding the pathological aspects of GSK3 β and tau in the development of TLE and AD.

Keywords: tau protein, GSK3 β , epilepsy, neurodegeneration, hippocampal sclerosis

OPEN ACCESS

Edited by:

Rena Li,
 Capital Medical University, China

Reviewed by:

Aline Stephan,
 Université de Strasbourg, France
 Fengquan Zhou,
 Johns Hopkins University,
 United States

*Correspondence:

Victoria Campos-Peña
 neurovcp@gmail.com

Received: 17 July 2019
Accepted: 23 January 2020
Published: 17 March 2020

Citation:

Toral-Rios D, Pichardo-Rojas PS,
 Alonso-Vanegas M and
 Campos-Peña V (2020) GSK3 β and
 Tau Protein in Alzheimer's Disease
 and Epilepsy.
Front. Cell. Neurosci. 14:19.
 doi: 10.3389/fncel.2020.00019

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is characterized by progressive memory loss, behavioral changes, and cognitive decline. Histopathologically, it is defined by the presence of neuritic plaques (NPs) conformed by fibrillar accumulation of amyloid beta-peptide (A β) and neurofibrillary tangles (NFTs) formed by the microtubule-associated protein (MAP) tau. These lesions produce microglial and astrocyte activation, leading to synaptic loss and neuronal death (Meraz-Ríos et al., 2013). It has been proposed that A β can interact with Frizzled receptors, impairing the

FORUM REVIEW ARTICLE

Metabolic Syndrome as a Risk Factor for Alzheimer's Disease: Is $A\beta$ a Crucial Factor in Both Pathologies?

Victoria Campos-Peña,¹ Danira Toral-Ríos,² Fernando Becerril-Pérez,³ Carmen Sánchez-Torres,⁴ Yair Delgado-Namorado,⁵ Elimar Torres-Ossorio,⁶ Diana Franco-Bocanegra,³ and Karla Carvajal⁷

Abstract

Significance: Recently, chronic degenerative diseases have become one of the main health problems worldwide. That is the case of Alzheimer's disease (AD) and metabolic syndrome (MetS), whose expression can be influenced by different risk factors. **Recent Advances:** In recent decades, it has been widely described that MetS increases the risk of cognitive impairment and dementia. MetS pathogenesis involves several vascular risk factors such as diabetes, dyslipidemia, hypertension, and insulin resistance (I/R). **Critical Issues:** Reported evidence shows that vascular risk factors are associated with AD, particularly in the development of protein aggregation, inflammation, oxidative stress, neuronal dysfunction, and disturbances in signaling pathways, with insulin receptor signaling being a common alteration between MetS and AD. **Future Directions:** Insulin signaling has been involved in tau phosphorylation and amyloid β ($A\beta$) metabolism. However, it has also been demonstrated that $A\beta$ oligomers can bind to insulin receptors, triggering their internalization, decreasing neuron responsiveness to insulin, and promoting insulin I/R. Thus, it could be argued that $A\beta$ could be a convergent factor in the development of both pathologies. *Antioxid. Redox Signal.* 00, 000–000.

Introduction

AT PRESENT, AVERAGE LIFE EXPECTANCY of individuals worldwide has dramatically increased to 80 years; this could be attributed to advances in the knowledge of diseases and the application of these in the healthcare system. However, increased longevity is not necessarily related to an increase in the quality of life of the individual; in fact, it is usually accompanied by a higher prevalence of chronic illnesses such as metabolic diseases, including obesity and diabetes mellitus (15, 54, 211).

In recent decades, it has been observed that diabetes and obesity could be risk factors for the development of neurodegenerative diseases. Recent epidemiological and clinical

studies have indicated that the incidence of obesity and diabetes in young adults with cognitive impairment is increasing; hence, it is believed that dementia disorders—particularly Alzheimer's disease (AD)—will increase significantly in the coming years (47, 48, 54, 55).

In the 1990s, Ott *et al.* were pioneers in proposing a strong association between diabetes and AD. Vascular disorders and malfunction of the endothelium could represent the link because they are common characteristic features in both pathologies; also, it is believed that patients with cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus (T2DM) are more likely to develop cognitive impairment (154, 170). Currently, there are many studies that support this theory and explain how these two disorders may course together (55, 57, 165, 166).

¹Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Mexico City, Mexico.

²Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico.

³Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.

⁴Departamento of Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico.

⁵Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City, Mexico.

⁶Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.

⁷Laboratorio de Nutrición Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, Mexico.

Chapter 23

Oxidative Stress, Metabolic Syndrome and Alzheimer's Disease

Danira Toral-Rios, Karla Carvajal, Bryan Phillips-Farfán,
Luz del Carmen Camacho-Castillo, and Victoria Campos-Peña

Abstract Oxidative stress, neuroinflammation, insulin signaling deficiency and vascular alterations are common features of many neurodegenerative disorders. Oxidative damage induces chronic inflammation, this condition may lead to insulin resistance and damage to the blood brain barrier (BBB), leading to an exacerbation of central inflammation, causing cognitive dysfunction eventually resulting in dementia. The major cause of dementia affecting the elderly is Alzheimer's disease, the most common cause of disability characterized by a progressive loss of memory and cognitive function. Neuropathologically, Alzheimer's disease is characterized by abnormal deposition of the amyloid β ($A\beta$) peptide and intracellular accumulation of neurofibrillary tangles (NFT) of hyper-phosphorylated tau protein. It has been proposed that $A\beta$ and NFT generate the neuronal damage that leads to cognitive failure, through the generation of reactive oxygen species (ROS). Alternatively, it has been suggested that oxidative damage precedes the accumulation of $A\beta$, NFT and other alterations such as vascular malfunction and metabolic syndrome. This chapter discusses the main molecular mechanisms associated to oxidative stress, metabolic syndrome and their relationship with Alzheimer's disease. We also include promising therapeutic strategies.

Keywords Alzheimer's Disease • Metabolic syndrome • Oxidative stress • Insulin resistance • Amyloid beta ($A\beta$) • Antioxidant therapies

D. Toral-Rios

Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, ZIP 07360 Mexico City, Mexico

K. Carvajal • B. Phillips-Farfán • L.d.C. Camacho-Castillo

Laboratorio de Nutrición Experimental, Instituto Nacional de Pediatría,
ZIP 045302 Mexico City, Mexico

V. Campos-Peña (✉)

Laboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Insurgentes Sur 3877, 14269 Mexico City, Mexico
e-mail: neurovcp@gmail.com

© Springer International Publishing Switzerland 2016
R.J. Gelpi et al. (eds.), *Biochemistry of Oxidative Stress*, Advances
in Biochemistry in Health and Disease 16, DOI 10.1007/978-3-319-45865-6_23

361

Evaluation of inflammation-related genes polymorphisms in Mexican with Alzheimer's disease: a pilot study

Danira Toral-Rios^{1†}, Diana Franco-Bocanegra^{2†}, Oscar Rosas-Carrasco³, Francisco Mena-Barranco⁴, Rosa Carvajal-García⁵, Marco Antonio Meraz-Ríos⁶ and Victoria Campos-Peña^{7*}

¹ Departamento de Psicología Biológica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Mexico City, Mexico, ² Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ³ Instituto Nacional de Geriátria, Mexico City, Mexico, ⁴ Hospital Regional de Alta Especialidad de Irapuato, Estado de México, Mexico, ⁵ Centro Geriátrico SINANK'AY, Querétaro, Mexico, ⁶ Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Mexico City, Mexico, ⁷ Laboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, Mexico City, Mexico

OPEN ACCESS

Edited by:

Karla Guadalupe Carvajal,
National Institute of Psychiatric,
Mexico

Reviewed by:

Chengxi Gou,
Northwestern University, USA
Diego Alban,
Istituto di Ricerche Farmacologiche
Mario Negri-IRCCS,
Italy

*Correspondence:

Victoria Campos-Peña,
Laboratorio Experimental de
Enfermedades Neurodegenerativas,
Instituto Nacional de Neurología y
Neurocirugía Manuel Velasco Suárez,
Mexico City, Insurgentes Sur 3877,
ZIP 14280, Mexico
vcomp@ymail.com

[†] These authors have contributed
equally to this work.

Received: 10 January 2015

Accepted: 31 March 2015

Published: 18 May 2015

Citation:

Toral-Rios D, Franco-Bocanegra D,
Rosas-Carrasco O, Mena-Barranco
F, Carvajal-García R, Meraz-Ríos MA
and Campos-Peña V (2015)
Evaluation of inflammation-related
genes polymorphisms in Mexican
with Alzheimer's disease: a pilot
study.
Front. Cell. Neurosci. 9:148.
doi: 10.3389/fncl.2015.00148

Amyloid peptide is able to promote the activation of microglia and astrocytes in Alzheimer's disease (AD), and this stimulates the production of pro-inflammatory cytokines. Inflammation contributes to the process of neurodegeneration and therefore is a key factor in the development of AD. Some of the most important proteins involved in AD inflammation are: clusterin (CLU), complement receptor 1 (CR1), C reactive protein (CRP), tumor necrosis factor α (TNF- α), the interleukins 1 α (IL-1 α), 6 (IL-6), 10 (IL-10) and cyclooxygenase 2 (COX-2). In particular, COX-2 is encoded by the prostaglandin-endoperoxide synthase 2 gene (PTGS2). Since variations in the genes that encode these proteins may modify gene expression or function, it is important to investigate whether these variations may change the developing AD. The aim of this study was to determine whether the presence of polymorphisms in the genes encoding the aforementioned proteins is associated in Mexican patients with AD. Fourteen polymorphisms were genotyped in 96 subjects with AD and 100 controls; the differences in allele, genotype and haplotype frequencies were analyzed. Additionally, an ancestry analysis was conducted to exclude differences in genetic ancestry among groups as a confounding factor in the study. Significant differences in frequencies between AD and controls were found for the single-nucleotide polymorphism (SNP) rs20417 within the PTGS2 gene. Ancestry analysis revealed no significant differences in the ancestry of the compared groups, and the association was significant even after adjustment for ancestry and correction for multiple testing, which strengthens the validity of the results. We conclude that this polymorphism plays an important role in the development of the AD pathology and further studies are required, including their proteins.

Keywords: Alzheimer's disease, inflammation, prostaglandin-endoperoxide synthase, cyclooxygenase 2, genetic ancestry

Review Article

Early Onset Alzheimer's Disease and Oxidative Stress

Marco Antonio Meraz-Ríos,¹ Diana Franco-Bocanegra,²
Danira Toral Ríos,³ and Victoria Campos-Peña⁴

¹Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Instituto Politécnico Nacional 2508, 07360 Mexico City, Mexico

²Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Universidad 3000, Coyoacan, 04510 Mexico City, Mexico

³Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Instituto Politécnico Nacional 2508, 07360 Mexico City, Mexico

⁴Laboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, Insurgentes Sur 3877, 14269 Mexico City, Mexico

Correspondence should be addressed to Victoria Campos-Peña; neurovcp@gmail.com

Received 12 September 2013; Accepted 18 November 2013; Published 14 January 2014

Academic Editor: Verónica Pérez de la Cruz

Copyright © 2014 Marco Antonio Meraz-Ríos et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia in elderly adults. It is estimated that 10% of the world's population aged more than 60–65 years could currently be affected by AD, and that in the next 20 years, there could be more than 30 million people affected by this pathology. One of the great challenges in this regard is that AD is not just a scientific problem; it is associated with major psychosocial and ethical dilemmas and has a negative impact on national economies. The neurodegenerative process that occurs in AD involves a specific nervous cell dysfunction, which leads to neuronal death. Mutations in APP, P51, and P52 genes are causes for early onset AD. Several animal models have demonstrated that alterations in these proteins are able to induce oxidative damage, which in turn favors the development of AD. This paper provides a review of many, although not all, of the mutations present in patients with familial Alzheimer's disease and the association between some of these mutations with both oxidative damage and the development of the pathology.

1. Introduction

Brain requires a high consumption of oxygen to generate adenosine triphosphate (ATP). It is known that oxygen metabolism in the mitochondria, endoplasmic reticulum (ER), and peroxisomes generates oxidant agents known as free radicals [1, 2], small molecules with unpaired electron that includes the oxygen reactive species (ROS) like hydroxyl radical (OH[•]), superoxide radical (O₂^{•-}), the reactive nitrogen species (RNS), and nitric oxide (NO[•]). These molecules show high reactivity with macromolecules [3] and have an important biological function as signaling molecules [4]. However the interaction of these agents and nonradical oxidants with membrane lipids, proteins, and DNA also could be conducted to cellular senescence. This oxidative damage is catalyzed by the presence of trace elements Fe, Cu or both [5].

As part of evolution, organisms have developed enzymatic and nonenzymatic antioxidants mechanism to counteract oxidative damage, which act removing free radicals, scavenging ROS/RNS or their precursors and binding trace elements [1]. The antioxidant enzymes are superoxide dismutase (SOD), catalase, and glutathione peroxidase (GPx). The nonenzymatic antioxidants group is composed of the natural molecules glutathione (GSH) and the reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), and compounds like ascorbic and lipoic acid, polyphenols and carotenoids dietary derived [6].

However, an imbalance of oxidants and antioxidants agents could generate oxidative stress, which results in a damage of macromolecules and disruption of reduction/oxidation (redox) signaling [7]. Mitochondrial dysfunction, excitotoxicity, and oxidative stress are common pathological

Review Article

Oxidative Stress and Metabolic Syndrome: Cause or Consequence of Alzheimer's Disease?

Diana Luque-Contreras,¹ Karla Carvajal,² Danira Toral-Rios,³
Diana Franco-Bocanegra,⁴ and Victoria Campos-Peña⁵

¹ *Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Boulevard V. Carranza S/N, Colonia República Oriente, Saltillo, COAH, Mexico*

² *Laboratorio de Nutrición Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur 3700 letra C, Coyoacán, 04530 Mexico City, Mexico*

³ *Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Instituto Politécnico Nacional, 2508, 07360 Mexico City, Mexico*

⁴ *Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Insurgentes Sur 3000, Coyoacán, 04510 Mexico City, Mexico*

⁵ *Laboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, Insurgentes Sur 3877, 14269 Mexico City, Mexico*

Correspondence should be addressed to Victoria Campos-Peña; neurovcp@gmail.com

Received 12 September 2013; Revised 2 December 2013; Accepted 18 December 2013; Published 20 January 2014

Academic Editor: José Pedraza-Chaverrí

Copyright © 2014 Diana Luque-Contreras et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Alzheimer's disease (AD) is a major neurodegenerative disease affecting the elderly. Clinically, it is characterized by a progressive loss of memory and cognitive function. Neuropathologically, it is characterized by the presence of extracellular β -amyloid ($A\beta$) deposited as neuritic plaques (NP) and neurofibrillary tangles (NFT) made of abnormal and hyperphosphorylated tau protein. These lesions are capable of generating the neuronal damage that leads to cell death and cognitive failure through the generation of reactive oxygen species (ROS). Evidence indicates the critical role of $A\beta$ metabolism in prompting the oxidative stress observed in AD patients. However, it has also been proposed that oxidative damage precedes the onset of clinical and pathological AD symptoms, including amyloid- β deposition, neurofibrillary tangle formation, vascular malfunction, metabolic syndrome, and cognitive decline. This paper provides a brief description of the three main proteins associated with the development of the disease ($A\beta$, tau, and ApoE) and describes their role in the generation of oxidative stress. Finally, we describe the mitochondrial alterations that are generated by $A\beta$ and examine the relationship of vascular damage which is a potential prognostic tool of metabolic syndrome. In addition, new therapeutic approaches targeting ROS sources and metabolic support were reported.

1. Introduction

It has been speculated that the free radicals produced during oxidative stress are pathologically important in AD and other neurodegenerative diseases. Oxidative stress can be defined as an imbalance between ROS production and/or their elimination. That oxidative stress implicated in the etiology of AD is possibly due to changes in the redox status that occur in AD brains [1]. In recent years, it has been proposed that not only oxidative stress is a significant early event in the development of the disease, but also it plays an important role in

modulating signaling pathways leading to cell death. Recent evidence has suggested that the presence of β -amyloid is crucial in the development of the pathology. $A\beta$ results from the sequential proteolysis of the amyloid precursor protein ($A\beta$ PP) by β -secretase (BACE1) and γ -secretase, a multiprotein complex. While, under physiological conditions, $A\beta$ appears to be unfolded, in pathological conditions, it is proposed that it increases the production of amyloid or its ability to aggregate [2, 3]. $A\beta$ toxicity is dependent on $A\beta$'s conformational state, peptide length, and concentration [4–8]. $A\beta$ deposition in the brain occurs not only in the



Inflammatory process in Alzheimer's Disease

Marco A. Meraz-Rios^{1†}, Danira Toral-Rios², Diana Franco-Bocanegra³, Juana Villeda-Hernández⁴ and Victoria Campos-Peña^{5*}

¹ Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Mexico City, Mexico

² Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Mexico City, Mexico

³ Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

⁴ Departamento de Neuropatología Experimental, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Mexico City, Mexico

⁵ Laboratorio Experimental de Enfermedades Neurodegenerativas, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, Mexico City, Mexico

Edited by:

Beatriz Gomez-Gonzalez,
Universidad Autónoma
Metropolitana, Unidad Iztapalapa,
Mexico

Reviewed by:

Benjamin Florin, Centro de
Investigación y de Estudios
Avanzados del IPN, Mexico
Clomda Anas, Universidad Nacional
Autónoma de México, Mexico
Abbas Mirshafiqi Tehran University
of Medical Sciences, Iran

*Correspondence:

Victoria Campos-Peña, Laboratorio
Experimental de Enfermedades
Neurodegenerativas, Instituto
Nacional de Neurología y
Neurocirugía Manuel Velasco
Suárez, Insurgentes Sur 3877, ZIP
14200, Mexico City, Mexico
e-mail: neurovcp@gmail.com

†Present address:

Marco A. Meraz-Rios,
Departamento de Biomedicina
Molecular, Centro de Investigación y
de Estudios Avanzados, Av. Instituto
Politécnico Nacional 2508, 2P
07360, Mexico City, Mexico

Alzheimer Disease (AD) is a neurodegenerative disorder and the most common form of dementia. Histopathologically is characterized by the presence of two major hallmarks, the intracellular neurofibrillary tangles (NFTs) and extracellular neuritic plaques (NPs) surrounded by activated astrocytes and microglia. NFTs consist of paired helical filaments of truncated tau protein that is abnormally hyperphosphorylated. The main component in the NP is the amyloid- β peptide (A β), a small fragment of 40–42 amino acids with a molecular weight of 4 kD. It has been proposed that the amyloid aggregates and microglia activation are able to favor the neurodegenerative process observed in AD patients. However, the role of inflammation in AD is controversial, because in early stages the inflammation could have a beneficial role in the pathology, since it has been thought that the microglia and astrocytes activated could be involved in A β clearance. Nevertheless the chronic activation of the microglia has been related with an increase of A β and possibly with tau phosphorylation. Studies in AD brains have shown an upregulation of complement molecules, pro-inflammatory cytokines, acute phase reactants and other inflammatory mediators that could contribute with the neurodegenerative process. Clinical trials and animal models with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) indicate that these drugs may decrease the risk of developing AD and apparently reduce A β deposition. Finally, further studies are needed to determine whether treatment with anti-inflammatory strategies, may decrease the neurodegenerative process that affects these patients.

Keywords: Alzheimer disease, amyloid- β , neurodegeneration, microglia, astrocyte, neuroinflammation, pro-inflammatory cytokine, anti-inflammatory strategies

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia in elderly adults. AD is clinically characterized by progressive loss of memory and other cognitive functions. Histopathologically is recognized by the presence of neuritic plaques (NPs) and neurofibrillary tangles (NFTs). The origin causes of AD can be classified as familial or sporadic. The incidence of familial cases is low (5–10%) and is related to the presence of mutations in three different genes: presenilin-1 (PS1), presenilin-2 (PS2), and amyloid- β precursor protein (APP- β) (Chartier-Harlin et al., 1991; Goate et al., 1991; Murrell et al., 1991; Levy-Lahad et al., 1995; Duff et al., 1996; Sisodia et al., 1999). Sporadic AD represents 90–95% of total cases, and although its etiology is multi-factorial, age is the main risk factor. Although there are different genetic and environmental causes, all patients have a similar clinical behavior and develop identical brain lesions: NFTs consisting of Tau (τ) protein and NPs consisting of amyloid- β (A β) peptides. These alterations are the final result of post-translational modifications and involve different genes and render AD as a complex multigenic neurodegenerative disorder.

In addition to this multi-genic complexity in AD, now we know that A β promotes an inflammatory response mediated by microglia and astrocytes, thus activating signaling pathways that could lead to neurodegeneration. It is currently unknown whether brain inflammation in AD patients is the cause of the disease or a secondary phenomenon. Although it was previously thought that the central nervous system (CNS) was an immune-privileged site, now is well known that certain features of inflammatory processes occur normally in response to an injury, infection or disease. The resident CNS cells generate inflammatory mediators, such as pro-inflammatory cytokines, prostaglandins (PGs), free radicals, complement factors, and simultaneously induce the production of adhesion molecules and chemokines, which could recruit peripheral immune cells. This review describes the cellular and molecular mediators involved in the inflammatory process associated with AD and several possible therapeutic approaches describe recently.

NPs AND A β IN THE NEURO-INFLAMMATORY PROCESS

NPs, are extracellular deposits structures that contain a highly insoluble fibrillar A β core formed by fragments of 39–42 amino

Anexo III. Carátula de artículo en proceso de publicación

Camacho *et al.*

Increased oxidative stress contributes to enhance brain amyloidogenesis and blunts energy metabolism in sucrose-fed rat: Effect of AMPK activation

Luz Camacho^{1*}, Bryan V. Phillips-Farfán^{1*}, Gabriela Rosas-Mendoza¹, Aidee Baires-López¹, Danira Toral-Ríos², Victoria Campos-Peña², Karla Carvajal¹

¹Laboratorio de Nutrición Experimental, Instituto Nacional de Pediatría

²Laboratorio de Enfermedades Neurodegenerativas, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco"

Running head: Brain OS related to MS & effect of AMPK activation

Corresponding author, address: Dr. Karla Carvajal

Laboratorio de Nutrición Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur 3700 C, Col. Insurgentes Cuicuilco, Del. Coyoacán, Mexico City, México 04530

Telephone: 5255-1084-0900 Ext. 1876

E-mail: karla_ca@yahoo.com

* These authors contributed equally to this work.