

2019
USO DEL PIROFOSFATO DE TIAMINA COMO TRATAMIENTO
NEUROPROTECTOR EN UN MODELO ANIMAL PARA LA ENFERMEDAD DE
ALZHEIMER (3XTG-AD)

BIOL. NELLY JOVANA PASTÉN
CASTREJÓN



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Medicina

USO DEL PIROFOSFATO DE TIAMINA COMO TRATAMIENTO NEUROPROTECTOR EN UN MODELO ANIMAL PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (3XTG-AD)

Tesis

Que como parte de los requisitos
para obtener el grado de la

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NEUROMETABOLISMO

Presenta

Biol. Nelly Jovana Pastén Castrejón

Dirigido por:

Dr. Hebert Luis Hernández Montiel

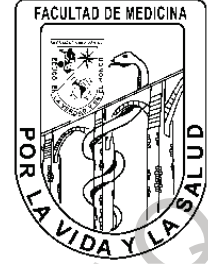
Co-Director:

Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda

Querétaro, Qro. Noviembre 2019



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN NEUROMETABOLISMO**



**USO DEL PIROFOSFATO DE TIAMINA COMO
TRATAMIENTO NEUROPROTECTOR EN UN MODELO
ANIMAL PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (3XTG-AD)**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS EN NEUROMETABOLISMO

Presenta

Nelly Jovana Pastén Castrejón

Dirigido por:

Dr. Hebert Luis Hernández Montiel

Co-dirigido por:

Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda

SINODALES

Dr. Hebert Luis Hernández Montiel
Presidente

_____ Firma

Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda
Secretario

_____ Firma

Dra. Ana Gabriela Hernández Puga
Vocal

_____ Firma

Dra. Ana Alicia Sánchez Tusie
Suplente

_____ Firma

M. en C. Carlos Lozano Flores
Suplente

_____ Firma

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Noviembre 2019
MÉXICO

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es resultado de la combinación de factores genéticos y epigenéticos, siendo la deshomeostasis del metabolismo de la glucosa, la neuroinflamación y la agregación de la proteína β -amiloide (β A) características patológicas que afectan áreas cerebrales relacionadas con el aprendizaje y la memoria. En la EA se ha observado que existe un estado de hipometabolismo a nivel cerebral que puede contribuir a la agregación anómala de la proteína β A lo que ocasiona reacciones metabólicas oxidantes, lo que podría estar relacionado con el aumento de células microgliales y neuroinflamación. Se ha propuesto que el metabolismo de la glucosa, dependiente del pirofosfato de tiamina (PPT, por sus siglas en inglés), es afectado por la disminución de las enzimas encargadas de su forma funcional. Existen fármacos capaces de suplir el déficit de PPT como es el X-2 (clorhidrato de PPT) que puede funcionar como un agente neuroprotector a nivel cognitivo y neurometabólico. En este estudio administramos PPT por medio de una bomba de infusión subdérmica en el ratón triple transgénico para la EA (3xTg-AD) y se evaluó su efecto sobre el desempeño conductual en tareas dependientes del hipocampo como el *nesting* y el laberinto acuático de Morris (LAM). A nivel histopatológico se evaluaron la cantidad de microglía y la acumulación de β A total (Iba-1, BAM10) en el *subiculum* y el CA1 hipocampal por medio de análisis inmunohistoquímico. Se trataron dos grupos de animales 3xTg-AD: uno con X-2 (TG PPT) y otro con vehículo (TG VHCL), comparados con dos grupos control de no transgénicos (NoTG PFT, NoTG VHCL) bajo los mismos tratamientos. Los resultados neuroanatómicos mostraron en el grupo TG PPT que hubo una menor acumulación de β A total en ambas áreas estudiadas en comparación con el grupo TG VHCL. En las observaciones conductuales también se observó una tendencia al retraso del déficit cognitivo en la prueba de *nesting* y durante la fase de adquisición en la prueba del LAM en el grupo TG PPT. Este trabajo contribuye al estudio del efecto de fármacos que pueden mejorar el estado metabólico y por consecuencia tener una función neuroprotectora.

Palabras clave: Pirofosfato de tiamina, neuroprotección, estrés nitro-oxidativo, neuroinflamación, enfermedad de Alzheimer, hipocampo.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the result of the combination of genetic and epigenetic factors, with glucose metabolism dehomeostasis, neuroinflammation and aggregation of the β -amyloid protein (β A) pathological characteristics that affect brain areas related to Learning and memory. In AD it has been seen that there is a state of hypometabolism at the brain level that can contribute to the abnormal aggregation of the β A protein which causes oxidative metabolic reactions, which could be related to the increase of microglial cells and neuroinflammation. It has been proposed that thiamine-dependent glucose metabolism is affected by the decrease in enzymes such as thiamine phosphokinase 1 (TPK1), which is responsible for the functional formation of thiamine, thiamine pyrophosphate (PPT). There are drugs capable of supplying the deficit of PPT such as X-2 (thiamine pyrophosphate hydrochloride) that can function as a neuroprotective agent at a cognitive and neurometabolic level. In this study, we administered PPT by means of a subdermal infusion pump in the triple transgenic mouse for AD (3xTg-AD) and its effect on behavioral performance in hippocampus-dependent tasks such as nesting and the Morris water maze was evaluated. At the histopathological level, the amount of microglia and the amount of total β A (Iba-1, BAM10) in subiculum and hippocampal CA1 were evaluated by immunohistochemical analysis. It is treated in two groups of 3xTg-AD animals: one with X-2 (TG PPT) and one with vehicle (TG VHCL), compared with two non-transgenic control groups (NoTG PPT, NoTG VHCL) under the same treatments. The results obtained at a neuroanatomic level that the TG PPT group had a lower risk of total loss of β A in total areas studied compared to the TG VHCL group, a behavioral level also found a tendency to delay the cognitive deficit in the test of nesting and during the acquisition phase of the LAM test in the TG PPT group. This work contributes to the study of the effect of drugs that can improve metabolic status, consequently having a neuroprotective function.

Keywords: thiamine pyrophosphate, neuroprotection, nitro-oxidative stress, neuroinflammation, Alzheimer's disease, hippocampus.

DEDICATORIAS

A mis padres, Vicky Castrejón y Javier Pastén por estar siempre en alegrías y desventuras, por educarme de la manera en que lo hicieron y por darme las bases para ser el ser humano que soy ahora.

A Alan Pastén, por alegrarme las noches de desvelo y acompañarme en lo aburrido y lo divertido, por sus críticas constructivas y por su innata curiosidad.

A Israel por ser mi apoyo principal en el laboratorio, por ser un gran equipo no sólo de trabajo, si no en la vida y por ser mi maestro, mi amigo y mi pareja en las buenas, las malas y las peores.

A mis amigos Emily Ramírez, Brenda Herrera, Daniela Blé, Andrés Loyden, Estefanía García y Kevin Herroz que soportaron el abandono en que los dejé para dedicarme a lo que me gusta y poder concluir este trabajo de investigación.

A Cinthia Lezama y Abigail Ramos por acompañarme en el arduo camino del estudio, por ser sinceras, ayudarme a mejorar mi investigación y hacerme ver la vida desde otra perspectiva.

A Xóchitl Mendoza Rojas por su fugaz amistad, fue, es y será una amiga con la que comparto la formación científica, los hobbies y la alegría de la vida.

A toda mi familia por poner sus esperanzas en que al final del camino seré un gran científico.

A todos mis compañeros dentro del laboratorio, porque sin su apoyo este y muchos otros trabajos de investigación no serían posibles.

A mis compañeros de posgrado que con sus opiniones, preguntas y críticas hicieron de mi formación un proceso más completo.

A mis ratones, por ser un gran modelo de estudio para el sistema nervioso, porque sin ellos no hubiese sido posible mi trabajo, ni ningún descubrimiento anterior a este.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro mi *Alma Mater*, la universidad que me formó como un ser humano integral y un honesto ciudadano, bajo el lema "Educo en la Verdad y en el Honor" valores de suma importancia y que asumo para reproducirlos a lo largo de mi vida.

Al Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme las instalaciones donde llevé a cabo el desarrollo y los experimentos de esta investigación y al apoyo brindado por la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Al apoyo económico brindado por CONACYT 324618 de becas nacionales para posgrado.

Al Dr. Hebert Luis Hernández Montiel y la Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda por su asesoría y ayuda en el desarrollo de este proyecto, por su dirección y todo su apoyo en mi formación dentro y fuera de la investigación.

A los Técnicos Académicos Azucena Ruth Aguilar Vázquez y Carlos Lozano Flores por su asesoría y apoyo técnico en el desarrollo de este proyecto.

Al M. en C. Jesús Mancilla Pérez por su asesoría a lo largo del proyecto, por permitir la colaboración en conjunto, y por su amistad y confianza.

A la M. en C. Adriana González Gallardo por su asesoría y apoyo en técnicas moleculares.

A la Dra. Ana Gabriela Hernández Puga por ser mi tutora de seguimiento y estar al pendiente de mis necesidades académicas y personales.

A la Dra. Ana Alicia Sánchez Tusie por sus comentarios y revisiones a cerca de mi trabajo.

Al M.V.Z. Martín García por su asesoría y apoyo técnico en el cuidado, mantenimiento y crianza de los animales del bioterio.

A la Dra. Alejandra Castillo por su especial ayuda en la manipulación de mis animales experimentales y por estar siempre atenta de mis necesidades dentro y fuera del bioterio.

A la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos de la Unidad de Microscopia por su apoyo técnico en la captura de imágenes y asesoría en microscopía confocal.

Al M. en C. Oscar Leonardo Ruíz Hernández jefe del departamento de compras al extranjero por estar siempre al pendiente y acelerar los procesos de mis peticiones.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. ANTECEDENTES | 3 |
| <i>II.1 Enfermedad de Alzheimer</i> | 3 |
| <i>II.2 Hipótesis de la cascada amiloide y βA</i> | 6 |
| <i>II.3 β-amiloide y cobre</i> | 8 |
| <i>II.4 Neuroinflamación; interacción microglía- βA</i> | 8 |
| <i>II.5 Neuroprotección en la EA</i> | 11 |
| <i>II.6 Pirofosfato de Tiamina</i> | 12 |
| <i>II.6 Tratamientos con PPT</i> | 14 |
| <i>II.7 Modelo triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD)</i> | 15 |
| III. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA..... | 17 |
| <i>III.1 Justificación</i> | 17 |
| <i>III.2 Pregunta de investigación</i> | 17 |
| IV. HIPÓTESIS | 17 |
| V. OBJETIVOS | 18 |
| <i>V.1 General</i> | 18 |
| <i>V.2 Particulares</i> | 18 |
| VI. MATERIAL Y MÉTODOS | 18 |
| <i>VI.1 Tipo de Investigación</i> | 18 |
| <i>VI.2 Población</i> | 18 |
| <i>VI.3 Implantación de bombas osmóticas y grupos experimentales</i> | 19 |
| <i>VI.4 Conducta</i> | 22 |
| <i>VI.6 Procesamiento del tejido</i> | 25 |
| <i>VI.7 Anticuerpos</i> | 25 |
| <i>VI.8 Inmunohistoquímica</i> | 26 |
| <i>VI.9 Microscopia y análisis de imagen</i> | 26 |
| <i>VI.10 Análisis estadístico</i> | 27 |
| VII. RESULTADOS | 28 |
| <i>VII.1 El PPT rescata la función innata de construcción del nido</i> | 28 |
| <i>VII.2 El PPT mejora la adquisición en la tarea de LAM en los ratones 3xTg-AD</i> | 29 |

| | |
|--|----|
| <i>VII.3 Disminución de BA total por efecto del PPT</i> | 30 |
| <i>VII.4 Cantidad de células microgliales y efecto del PPT</i> | 32 |
| VIII. DISCUSIÓN..... | 34 |
| IX. CONCLUSIONES | 37 |
| X. BIBLIOGRAFÍA..... | 38 |
| XI. APÉNDICES..... | 46 |

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Lesiones histopatológicas de la enfermedad de Alzheimer. | 5 |
| Figura 2. Representación de la hiperfosforilación de la proteína tau | 6 |
| Figura 3. Procesamiento enzimático de la proteína precursora amiloide (PPA) | 7 |
| Figura 4. Aumento de la cantidad de células microgliales. | 10 |
| Figura 5. Modelo murino para Alzheimer 3xTg-AD..... | 16 |
| Figura 6. Diseño experimental | 22 |
| Figura 7. Plano del tanque para LAM..... | 24 |
| Figura 8. Puntuación de la tarea de nesting | 28 |
| Figura 9. Adquisición de la tarea de LAM..... | 29 |
| Figura 10. Fotomicrografías de la inmunohistoquímica enzimática de BAM10 | 30 |
| Figura 11. Fotomicrografías de la inmunohistoquímica enzimática de BAM10..... | 31 |
| Figura 12. Número de partículas de BAM10+ por área | 31 |
| Figura 13. Fotomicrografías de la inmunohistoquímica enzimática de Iba-1 | 32 |
| Figura 14. Fotomicrografías de la inmunohistoquímica enzimática de Iba-1 | 33 |
| Figura 15. Número de células positivas a Iba-1..... | 33 |

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un padecimiento neurodegenerativo progresivo, irreversible, clasificado como una demencia asociada a la edad, que por el movimiento en los cambios demográficos etarios, promete ser una carga económica a nivel global. Los desafíos principales en la actualidad incluyen la falta de biomarcadores confiables para su diagnóstico temprano, así como la falta de estrategias y tratamientos preventivos (Invernizzi et al., 2017; Mangialasche, Solomon, Winblad, Mecocci, y Kivipelto, 2010; Berk, Paul, Sabbagh, 2014).

Por otro lado, la ciencia ha avanzado en la comprensión de la patogénesis definiendo la EA como un síndrome multifactorial que se caracteriza por lesiones neuropatológicas que incluyen la formación de placas causadas por la deposición de los oligómeros tóxicos de la proteína β -amiloide (β A) y por los ovillos neurofibrilares (ONFs) ocasionadas por modificaciones anormales de la proteína tau, lo que provoca la pérdida de sinapsis, la muerte neuronal, además de gliosis reactiva, neuroinflamación y alteración de las células microgliales (Rodríguez, Witton, Olabarria, Noristani, y Verkhatsky, 2010) en áreas involucradas con el aprendizaje y la memoria, como la corteza y el hipocampo (Goedert y Spillantini, 2006; Barrow y Small, 2007).

Sin embargo la evidencia experimental y clínica también ha sugerido que las manifestaciones de la EA no se restringen únicamente al sistema nervioso central (SNC), si no que la patología también tiene una vinculación con alteraciones sistémicas o compartidas como la alteración del metabolismo de la glucosa a nivel somático y central que se sabe precede a síntomas clínicos y la atrofia cerebral y puede manifestarse incluso durante décadas (Kennedy et al., 1995; Herholz, Carter, Jones, 2007; Mosconi, Pupi, y De Leon, 2008).

En el cerebro la tiamina es crítica para el metabolismo de la glucosa como cofactor de varias enzimas limitantes del ciclo de Krebs y la ruta de las pentosas encargadas de regular el metabolismo energético. Aunado a esto investigaciones epidemiológicas también han demostrado que la EA está asociada con una deficiencia de tiamina y la alteración de procesos dependientes de tiamina en el

metabolismo de la glucosa (Mastrogiacomo, Lindsay, Bettendorff, Rice, y Kish, 1996; (Glaso, Nordbo, Diep, y Bohmer, 2004; Gibson y Blass, 2007).

Por otro lado la neuroinflamación en la patología, representada por un aumento en la cantidad de células microgliales, que inducen la producción de factores como óxido nítrico (NO), especies reactivas de oxígeno (EROs), citocinas proinflamatorias y prostaglandinas, pueden promover la aceleración de la neurodegeneración (Akiyama et al., 2000; Kitazawa et al., 2004). Estos factores, pueden alterar la actividad en terminales nerviosas causando la disfunción y la pérdida de sinapsis (Rodríguez, Witton, Olabarria, Noristani y Verkhratsky, 2010), que tiene relación con la disminución de la memoria en la EA (Agostinho, Cunha y Oliveira, 2010). Asimismo, se ha reportado que la deficiencia de tiamina puede causar muerte neuronal selectiva, inflamación y activación glial anormal, características de enfermedades neurodegenerativas como la EA. También se sabe que el déficit de tiamina aumenta la actividad de la β -secretasa cerebral por lo que se exacerba la deposición de β A en modelos de ratón transgénicos para la EA (Karuppagounder et al., 2009). Sin embargo, la interacción de la microglía en respuesta a β A, no ha sido estudiada por completo (Ill-Raga et al., 2010).

Lo anterior propicia el estudio de fármacos, que sean capaces de funcionar como neuroprotectores, rescatando, recuperando y/o regenerando las funciones neuronales en modelos *in vivo* que simulan características neuropatológicas de la EA como lo es el ratón 3xTg-AD (Oddo et al., 2003), el cual es una estrategia prometedora para el tratamiento y la comprensión de mecanismos en la EA (Choi et al., 2010; Beck et al., 2015). Este modelo que desarrolla la patología de manera progresiva (en etapas asintomática, pre y sintomática), permite hacer intervenciones para el estudio de factores como la pérdida de la homeostasia en el SNC y la neuroinflamación (Cole et al., 2010; Tramutola, Lanzillotta, Perluigi, y Butterfield, 2016).

En este estudio administramos el fármaco X-2, compuesto por clorhidrato de pirofosfato de tiamina, que representa la forma activa de la vitamina B1, que es un cofactor necesario en el metabolismo de la glucosa y por ende para la producción de energía, para observar su efecto neuroprotector sobre la acumulación de β A y la

cantidad de microglía en las áreas cerebrales de interés relacionadas con el aprendizaje y la memoria. Este X-2 se administró en ratones hembras de 9 meses de edad (m.d.e.) del modelo triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD), y en donde se evaluaron el desempeño conductual en una tarea innata (construcción del nido, *nesting*) y una tarea de referencia espacial (Laberinto Acuático de Morris, LAM). En estos ratones, se estudiaron con técnicas de histología por inmunohistoquímica, en *subiculum* y CA1 hipocampal, la cantidad de microglía y la acumulación de β A total (Iba-1, BAM10). Se trataron dos grupos de animales 3xTg-AD: uno con X-2 (TG PPT) y otro con vehículo (TG VHCL), comparados con dos grupos control de no transgénicos (NoTG PPT, NoTG VHCL) bajo los mismos tratamientos. El análisis densitométrico, reveló que los animales del grupo TG PPT tuvieron menor acumulación significativa de β A total en ambas áreas estudiadas en comparación con el grupo TG VHCL. Además a nivel conductual también se observó una tendencia al retraso cognitivo en la prueba de *nesting* y durante la fase de adquisición de la prueba del LAM. Este trabajo contribuye al estudio del efecto de fármacos multifuncionales, que pueden mejorar el estado metabólico y por consecuencia tener una función neuroprotectora, como el PPT, considerando que este tratamiento pudiera tener un efecto en la disminución de la pérdida de la homeostasis del metabolismo cerebral en la EA, y así mismo contribuir al descubrimiento de otros mecanismos patológicos que participan por vías alternas.

II. ANTECEDENTES

II.1 Enfermedad de Alzheimer

La EA es un padecimiento neurodegenerativo, progresivo e irreversible, clasificado como una demencia dependiente de la edad que afecta individuos de la población que se encuentran entre los 65 y 85 años, ocasiona un fuerte deterioro cognitivo que tiene como consecuencia la pérdida de la memoria y las aptitudes del pensamiento, además de signos como problemas de lenguaje, desorientación y comportamiento impredecible, que complican e impiden la realización de la vida diaria de los afectados (Prince, 2015). Dado que la población cada vez tiene una

mayor expectativa de vida, los casos de Alzheimer se multiplican continuamente no sólo en México sino alrededor del mundo (Swomley et al., 2014).

Cifras mundiales sugieren que existen cerca de 47.5 millones de pacientes con demencia, y según la Organización Mundial de la Salud se registran 7.7 millones de casos nuevos cada año (Prince, Albanese, Guerchet y Prina, 2014). En México el Instituto Nacional de Geriátrica estima que 800,000 personas están afectadas por algún tipo de demencia, siendo la EA la causa más común, acaparando entre un 60% y 70% de los casos (Gutierrez-Robledo y Arrieta-Cruz, 2015).

La EA fue clínicamente descrita por el psiquiatra Alois Alzheimer en 1906, quién reportó el caso de su paciente August Deter de 51 años de edad que presentaba signos de deterioro cognitivo y dificultad para recordar cosas recientemente aprendidas. En un análisis *post-mortem* de su cerebro, el Dr. Alzheimer describió por primera vez las lesiones histopatológicas clásicas de la enfermedad (Fig. 1) que ahora conocemos, como las placas β -amiloide (β A) y los ovillos neurofibrilares (ONFs) de la proteína tau (Alzheimer, 2006).

Actualmente la enfermedad de Alzheimer se define como un continuo biológico caracterizado por anomalías proteínicas características que pueden ser diagnosticadas en pacientes *in vivo* por medio de biomarcadores específicos de neurodegeneración como el sistema AT(N), por la amiloidosis, la taupatía, y la concierne neurodegeneración, aunque esto no significa que no haya influencia de otros trastornos, ni que estas proteínas sean las causantes de la enfermedad, sino que es un proceso patológico que se desarrolla en un continuo multifactorial lo que puede en conjunto conducir a la demencia y más específicamente a una demencia amnésica multi-dominio de tipo Alzheimer, que puede o no presentar síntomas de deterioro cognitivo pero que sólo es confirmada con evaluaciones del tejido cerebral *post mortem* (Jack et al., 2018).

Ambas proteínas, β A y tau, se han relacionado con otros padecimientos donde debido a la alteración genética se genera una sobreexpresión, acumulación o desarreglo de éstas, dando lugar a discapacidades cognitivas variables y una patología similar a la EA (Goate et al., 1989; Cole et al., 2010).

Naturalmente la proteína tau forma parte del citoesqueleto y está asociada a los microtúbulos, su función es fundamental para mantener las neuronas morfológicamente estables. Se ha sugerido que la contribución de esta proteína a la patología de la EA depende por un lado, del desprendimiento de tau de los microtúbulos después de la hiperfosforilación por las cinasas GSK-3 β y Cdk5 con su subunidad p25 lo que provoca su desarreglo y acumulación en ONFs (Fig. 2), y por otro lado de mutaciones o cambios postraduccionales que ocasionan deterioro en la función microtubular y del transporte axonal (Jaworski,2010; Medina y Ávila, 2014).

Además, en esta enfermedad se observa también atrofia cerebral, pérdida de neuronas, angiopatía amiloide y otras lesiones moleculares relacionadas al daño oxidativo e inflamatorio, que conducen a disfunción sináptica en áreas cerebrales relacionadas con el aprendizaje y la memoria como la corteza y el hipocampo. (Cole et al., 2010; Querthfurth y La Ferla 2010).

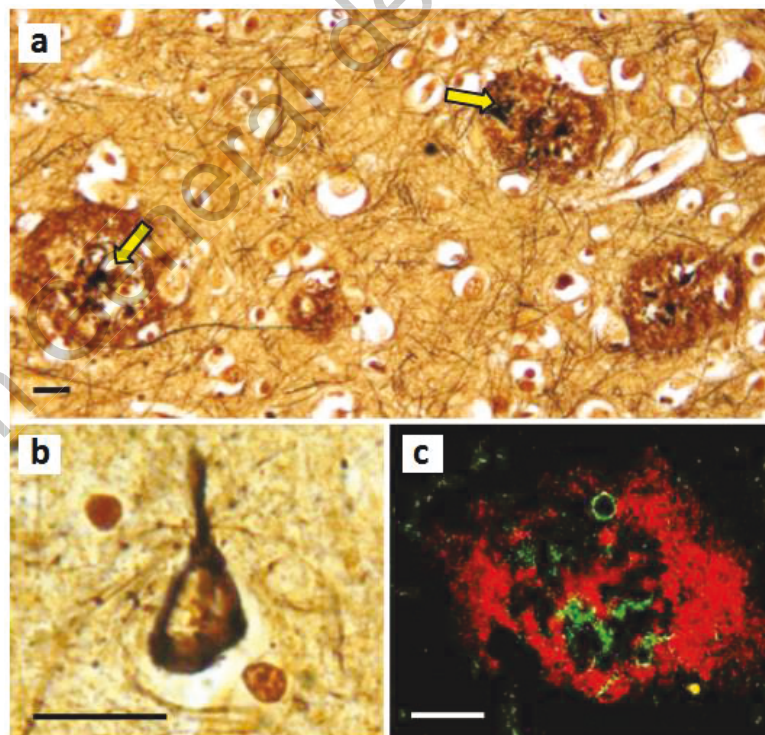


Figura 1. Lesiones histopatológicas de la enfermedad de Alzheimer. Placas amorfas de β A con neuritas distróficas (flechas amarillas) (a). Ovillo neurofibrilar (b). Placa amiloide teñida con anti- β A (rojo) e Iba-1 (verde) (c). La barra en cada imagen equivale a 40 μ m. Tomado de O'Brien y Wong (2011).

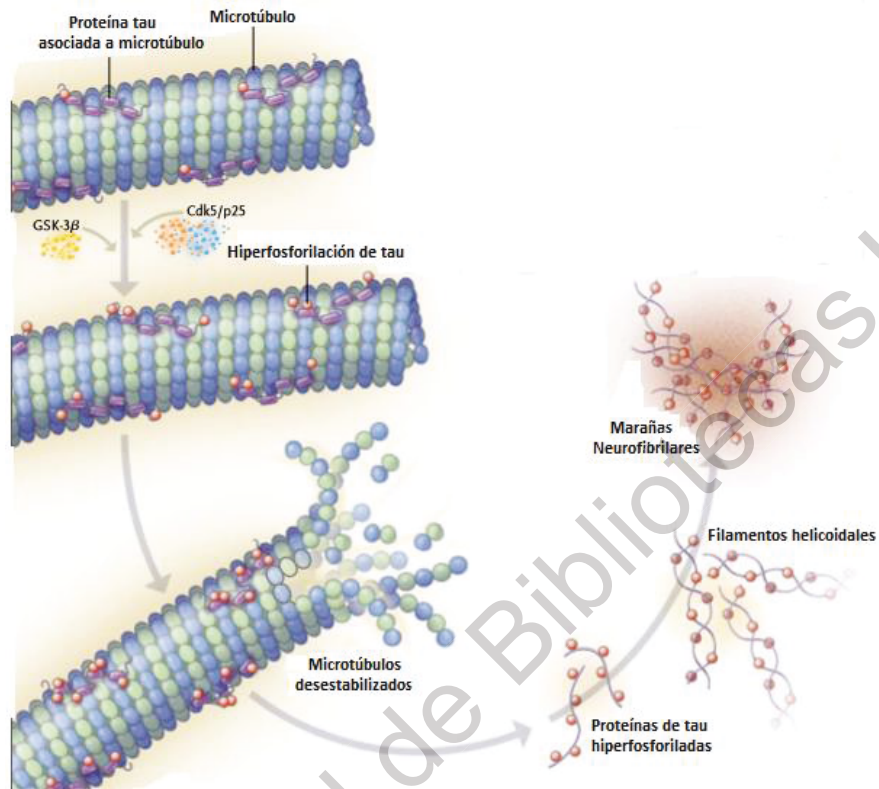


Figura 2. Representación de la hiperfosforilación de la proteína tau y formación de marañas neurofibrilares a partir de su desestabilización por las cinasas (GSK-3 β ; glicógeno sintasa 3 y Cdk5/p25; dependiente de ciclina 5 y su subunidad). Modificado de Querthfurth y La Ferla (2010).

11.2 Hipótesis de la cascada amiloide y βA

A partir de múltiples estudios realizados para descubrir la problemática central de la EA, Hardy y Higgins propusieron el mecanismo de "la hipótesis de la cascada amiloide" en la que se asume que la deposición de la proteína βA en forma de placas, es el agente causativo y principal disparador de otros elementos de la patología como la pérdida neuronal, el daño vascular y las alteraciones de la proteína tau que promueven la neurodegeneración (Hardy y Higgins, 1992; Hardy y Selkoe, 2002).

En el organismo, la proteína βA es expresada regularmente en todos los tejidos y fluidos biológicos (Glabe y Bush, 2007) como producto de la proteína

precursora amiloide (PPA), una proteína transmembranal enzimáticamente procesada por 3 secretasas; la α , β y γ (Fig. 3), que produce principalmente dos fragmentos de β A por la vía amiloidogénica en el cerebro. El fragmento de β A-42 representa del 5 al 10% de la cantidad total de proteína producida, asimismo es el relacionado con la EA por su capacidad de agregarse en fibrillas amiloides que más tarde se acumulan en placas (Gouras et al., 2000). La agregación de β A depende de varias fases, entre las cuales se encuentran la nucleación y la elongación que conllevan a la formación de diferentes especies amiloides como monómeros, oligómeros, protofibrillas y fibrillas insolubles (Mohamed, Cortez, y de Chaves, 2011).

Por otro lado, en muestras de cerebros de pacientes con EA, se ha demostrado que β A se encuentra asociada a elementos macromoleculares como glucosaminoglucanos, lípidos de la membrana celular, otras proteínas y de manera importante a iones metálicos que pueden influir en la agregación amiloide y provocar efectos tóxicos (Thinakaran y Koo, 2008; Cole et al., 2010).

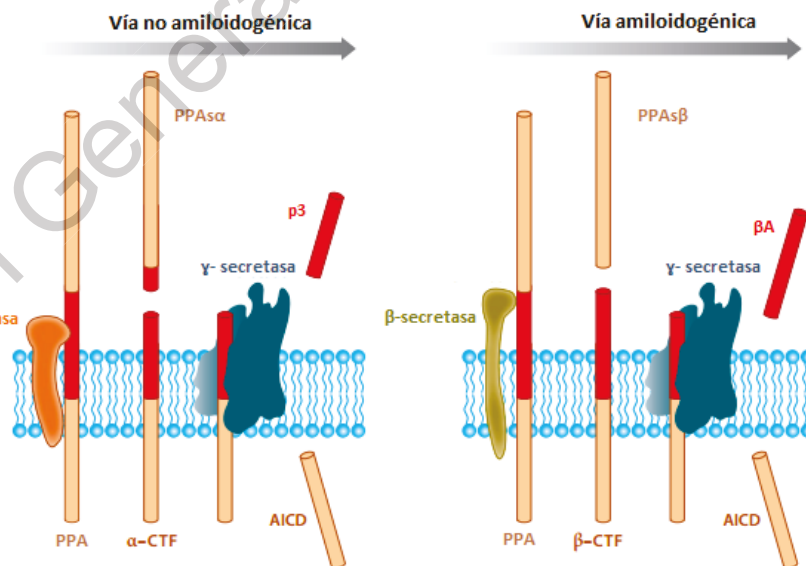


Figura 3. Procesamiento enzimático de la proteína precursora amiloide (PPA). A la derecha, la escisión de α -secretasa en PPA inicia el procesamiento no amiloidogénico seguido del corte de la γ secretasa (vía no amiloidogénica). A la izquierda, el procesamiento amiloidogénico de PPA que implica la escisión de la β -secretasa seguido por el de γ -secretasa (vía amiloidogénica). Modificado de O'Brien y Wong (2011).

II. 3 β -amiloide y cobre

Existen varios trabajos de investigación en los que se plantea que los metales endógenos como cobre (Cu), hierro (Fe) y zinc (Zn) están involucrados de alguna manera como factores o cofactores en la etiología de la EA (Barnham, Masters, & Bush, 2004), y en congruencia con esto, se ha demostrado que la asociación de dichos iones metálicos con la proteína β A se ve implicada en la progresión y el desarrollo de la patología (Lovell, Robertson, Teesdale, Campbell y Markesbery, 1998). En especial, el Cu tiene una fuerte afinidad de unión a PPA y β A, y se ha planteado que su presencia puede facilitar la producción y agregación de β A en el cerebro (Bush, 2003; Tougu et al., 2008).

Este metal es un micro-elemento esencial para mecanismos enzimáticos en el metabolismo cerebral (Donnelly, Xiao, y Wedd, 2007), presente en diferentes concentraciones y formas químicas, el Cu es estrictamente regulado por proteínas chaperonas, que establecen y mantienen la homeostasis de este metal asegurando su distribución en blancos celulares específicos además de regular su estado de oxidación (Johnson y Giulivi, 2005).

Entre un 85 a 95% del Cu circulante en la sangre está unido a ceruloplasmina y el restante corresponde a Cu libre de bajo peso molecular no unido a proteínas, que puede llegar a traspasar la barrera hematoencefálica. Además, funciona como cofactor de enzimas como la citocromo c oxidasa y de la Cu,Zn-superóxido dismutasa, que desempeñan papeles clave en el transporte de electrones y median la respuesta celular al estrés oxidativo (Squitti, 2014).

Las observaciones experimentales, clínicas y epidemiológicas en trastornos neurodegenerativos como la EA han demostrado que existe un vínculo entre la homeostasis de iones metálicos gravemente desregulada y la patología neuronal selectiva que puede ser ocasionada por una facilitación de la agregación de amiloides por metales (Lovell et al., 1998; Zatta et al., 2009).

II.4 Neuroinflamación; interacción microglía- β A

La neuroinflamación en la EA se puede definir como un cambio en el número de células microgliales (Rodriguez et al., 2010), que inducen la producción de factores

como NO, EROs, citocinas pro-inflamatorias y prostaglandinas que promueven la neurodegeneración (Fig. 4), (Mangialasche et al., 2010; Akiyama et al., 2000; Kitazawa et al., 2004).

La microglía regulan la respuesta inmune y su homeostasis (Streit, 2002; Hanisch y Kettenmann, 2007). Sin embargo, cuando se pierde la homeostasis por una lesión o enfermedad, la microglía adquiere un estado “activo” y una morfología “ameboide” acompañada de cambios en la expresión génica y por tanto, cambios funcionales (Hanisch y Kettenmann, 2007; Huh et al., 2003; Kreutzberg, 1996). El proceso de activación de la microglía le permite adquirir diversos fenotipos asociados a la protección o a la citotoxicidad (Schwartz, Butovsky, Brück y Hanisch, 2006). La diversidad de fenotipos de la microglía aún sigue siendo controversial. Sin embargo, actualmente existen dos postulados aceptados: el estado de activación alternativo (M2) y el clásico (M1); el primero, se ha asociado a la neuroprotección del SNC, ya que induce la liberación de citocinas anti-inflamatorias como IL-4 e IL-10 que participan en inhibir la inflamación y en promover la capacidad fagocítica de la microglía (Cherry, Olschowka, y O'Banion, 2014). Mientras que el segundo tipo por actividad clásica o M1 responde a LPS, IFN γ , PMAPs y PMADs (patrones moleculares asociados a patógenos y a daño), produciendo una respuesta inflamatoria masiva en la que se libera IL-1 β , IL-12 y TNF- α y regula la expresión de iNOS (Calsolaro y Edison, 2016; Venegas y Heneka, 2017).

Se sabe también que la microglía responde a moléculas endógenas relacionadas con células necróticas y moléculas derivadas de mecanismos protectores patogénicos por medio de TLRs (*Toll Like Receptors*). TLR6, TLR4 y TLR2 reconocen a la proteína β A (Akira, 2003; Glass, Saijo, Winner, Marchetto y Gage, 2010) y activan vías de NF κ B (factor nuclear kappa B) y MAPk (quinasas activadoras de mitógenos) lo que da lugar a dos eventos fundamentales: la producción de diversas citocinas pro y anti-inflamatorias, además de factores de transcripción, incluyendo IL-1, TNF- α , IL-6, IL8 e IFN- γ y como segundo evento la activación de MCP-1 (proteína quimio atrayente de monocitos 1) que tiene como objetivo principal reclutar y llamar a células gliales como los astrocitos. También como parte del proceso en conjunto se transcribe y se expresa iNOS que produce

NO e influye en la motilidad celular, fagocitosis, muerte celular y presentación de antígenos, y asimismo en el daño nitro-oxidativo (Akiyama et al., 2000).

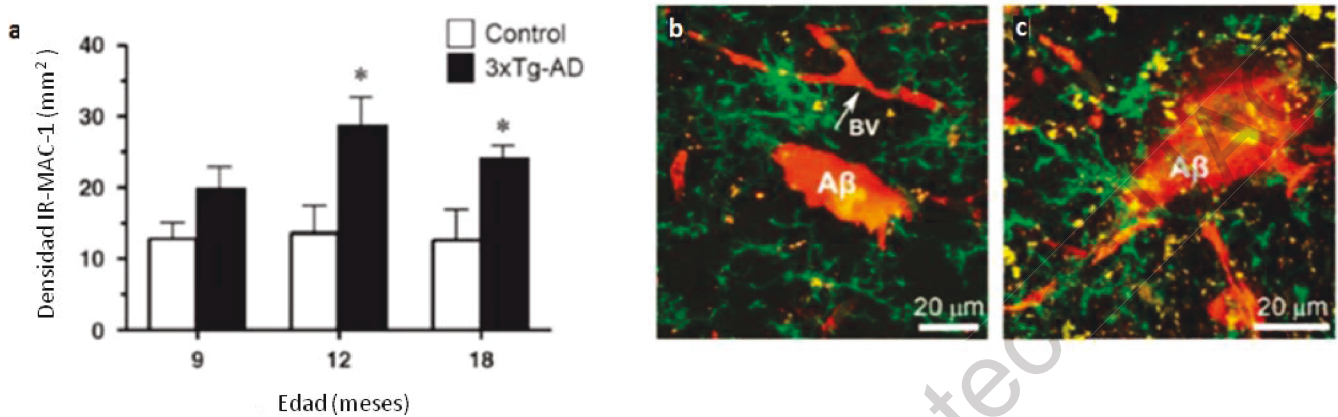


Figura 4. Aumento de la cantidad de células microgliales. Incremento en la densidad celular en mm² de microglía activada detectada con el anticuerpo MAC-1 que reconoce al antígeno CD11b (integrina alfa M de la microglía) en la región de CA1 hipocámpal (a). Imágenes confocales de la inmunoreactividad de (MAC-1) microglía activada (verde) junto con placas de la proteína β A (rojo) en la región de CA1 del hipocampo de ratones 3xTg-AD de 18 m.d.e (b,c). Modificado de Rodríguez et al. (2010).

Asimismo se ha reportado que la neuroinflamación y la producción crónica de citocinas pro-inflamatorias y otras moléculas derivadas de la activación microglial pueden contribuir a la neurodegeneración e incluso participar en la agregación de β A en placas (Zilka, Ferencik y Hulin, 2005), lo que sugiere que la neuroinflamación es un proceso importante que forma parte del círculo vicioso de la agregación de la proteína β A, el daño neuronal, el estrés nitro-oxidativo y la muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas y específicamente en la EA (Calsolaro y Edison, 2016).

Sumado a lo anterior varios trabajos donde usan el ratón transgénico para la enfermedad de Alzheimer 3xTg-AD reportan un aumento significativo en la cantidad de células microgliales a los 12 y 18 m.d.e. en comparación con los no transgénicos y los transgénicos de edades más cortas, además relacionan el aumento con las placas de β A con dicho aumento celular, concluyendo que la patología de la EA desencadena una reacción microglial compleja donde en etapas iniciales de la EA

se puede observar el aumento de células ramificadas que con el envejecimiento y avance de la enfermedad cambian su morfología (Rodríguez et al., 2010; 2013).

11.5 Neuroprotección en la EA

Las demencias son una de las crisis de salud pública prevalecientes en la actualidad el número de personas que padecen demencia es considerable, y estos números continuarán aumentando debido a los cambios demográficos de la población a edades más avanzadas y los aumentos en la salud y la longevidad a nivel mundial, esto aunado a la disminución de la fertilidad, pronostica un aumento en la población con demencia, sin olvidar mencionar que actualmente no hay tratamientos modificadores de la enfermedad, lo que nos da como única opción viable la prevención de riesgos de desarrollar enfermedades neurodegenerativas a partir de tratamientos preventivos multifactoriales superpuestos que abran alternativas para la intervención (Bennett, 2017).

Sin embargo, las investigaciones clínicas y experimentales han sido dirigidas al estudio de los factores de riesgo en el desarrollo de la EA, la comprensión de mecanismos y al estudio de terapias retardantes y neuroprotectoras que sirvan como estrategias útiles en la protección contra las lesiones o la degeneración de las células, previniendo así la descomposición del SNC. Es importante reconocer que las terapias neuroprotectoras muchas veces no revierten el daño ya causado, si no que se centran en evitar el adicional, lo que remarca la importancia de tomar la patología de la EA como un continuo biológico multifactorial para poder determinar ventanas de tiempo específicas que nos permitan realmente proveer una defensa al SN (Jack Jr et al., 2018).

Existen fármacos y terapias neuroprotectoras que de acuerdo a sus funciones y restricciones biológicas se ordenan en dos grandes grupos; los limitadores de la muerte celular y los que contrarrestan la neurodegeneración, los primeros interactúan por lo general con proteínas asociadas a la apoptosis y otros tipos de muerte celular, mientras que los segundos abarcan una gama de procesos metabólicos celulares que se alteran y están relacionados con los cambios patológicos en la neurodegeneración como el estrés oxidativo y nitro-oxidativo, la excitotoxicidad, la inflamación, la pérdida de la homeostasia iónica o la

desregulación del metabolismo de la glucosa y el deterioro del metabolismo energético (Vajda, 2004; Longo y Massa, 2004).

II.6 Pirofosfato de Tiamina

La vitamina B1 o tiamina, también conocida como aneurina, es una vitamina esencial soluble en agua que se obtiene de la dieta y la microsuplementación, ya que puede ser sintetizada sólo por bacterias, hongos y plantas, pero no por mamíferos, está presente en las plantas en forma de tiamina libre y en los tejidos animales en sus formas fosforiladas (Marcé-Grau, et. al, 2019). Químicamente la vitamina B1 está compuesta por una pirimidina y un anillo de tiazol unidos por un grupo metileno, formando una estructura que contiene azufre. Es importante resaltar que la tiamina necesita ser fosforilada para poder participar en múltiples procesos metabólicos como la catálisis de la conversión de piruvato en acetil-CoA, la descarboxilación del alfa-cetoglutarato en el ciclo de Krebs, la descarboxilación de alfa-cetoácidos de cadena corta ramificada, la degradación de ácidos grasos en los peroxisomas, entre otros, actuando como cofactor de enzimas limitantes de dichos procesos (Manzetti, Zhang, y van der Spoel, 2014; Turck et al., 2016).

Las principales fuentes de tiamina para los humanos son la carne y productos cárnicos (28.2%), seguidos de los cereales y granos enteros (23.2%), legumbres y verduras (11.6%), leche, productos lácteos (9.5%) y frutas (6.4%) (Mielgo-Ayuso et al., 2018). La tiamina es un cofactor fundamental para el mantenimiento del metabolismo de los carbohidratos, además de estar involucrada en procesos metabólicos intermediarios dentro de las células a nivel del citosol, la mitocondria y los peroxisomas, en los humanos la vida media de la aneurina o tiamina es de 9 a 18 días y se elimina por la orina y las heces fecales (Manzetti et al., 2014). Los requerimientos mínimos de tiamina en adultos van de los 0.4-1.1mg/día en mujeres, 0.6-1.2mg/día en hombres y de 0.3-0.9mg/ en niños en edad escolar (Wang et al., 2018). Una vez que tiamina es consumida, ésta es absorbida en la parte proximal del intestino grueso, donde las fosfatasa hidrolizan los ésteres de fosfato de tiamina y los convierten en tiamina libre (Turck et al., 2016; Said, Balamurugan, Subramanian, y Marchant, 2004). La absorción de tiamina libre se lleva a cabo por

el transportador de tiamina 1 y 2 (ThTR-1, ThTR-2) codificado por el gen SLC19A2 y SLC19A3 respectivamente, estos transportadores son proteínas transmembrana que se expresan a lo largo de los enterocitos de los intestinos delgado y grueso (Said et al., 2004). La regulación de la absorción de tiamina en el intestino depende de las concentraciones y el requerimiento de tiamina, por ejemplo una deficiencia dietética induce la síntesis de más ThTR-2 a través de mecanismos transcripcionales (Reidling y Said, 2005).

El contenido corporal total de tiamina se estima en 25 a 30mg, ubicados en músculos esqueléticos, corazón, cerebro, hígado y riñones, en la sangre el 80% de la tiamina se encuentra en los eritrocitos como PPT (Manzetti et al., 2014). La tiamina libre cruza las membranas celulares y se puede encontrar en fluidos extracelulares y en el líquido cefalorraquídeo (LCR). Al llegar al torrente sanguíneo la tiamina se une a transportadores de tiamina de alta afinidad e ingresa a los eritrocitos donde se fosforila y forma PPT, en las células dos enzimas se encargan de fosforilar a la tiamina libre para la formación de PPT; la tiamina fosfocinasa 1 (TPK1) y la fosforil transferasa (TTPATP), ambas están expresadas en el intestino delgado, el riñón, cerebro, hígado, bazo y la placenta durante el embarazo (Zhao, Gao, y Goldman, 2001; Marcé-Grau et al., 2019).

A nivel del SNC en modelos *in vitro* se ha identificado un papel crítico del metabolismo de la tiamina en la regulación del crecimiento del soma neuronal y el desarrollo de la complejidad del árbol dendrítico de las células piramidales del hipocampo (H. Liu et al., 2017), una de las estructuras principalmente afectadas en la EA. Además la suplementación con tiamina como un tratamiento en pacientes con deficiencia de tiamina por defecto genético relacionado con los transportadores, la TPK1 o déficit metabólico va de 100-500mg/día, lo que asegura un neuro desarrollo normal en los pacientes cuando son tratados a tiempo, por otra parte también se ha demostrado que se pueden prevenir las descompensaciones metabólicas (Invernizzi et al., 2017) y produce mejoras en lesiones cerebrales (Banka et al., 2014).

También se ha sugerido que la tiamina está asociada con enfermedades neurodegenerativas a través de su papel en el metabolismo oxidativo y de glucosa

(Gibson y Green, 2002; Gibson et al., 2013). La deficiencia de tiamina es una condición común en adultos mayores, y en especial los pacientes hospitalizados, además se ha sugerido su asociación con la EA y la depresión (Pepersack et al., 1999). En las autopsia de pacientes con EA se ha encontrado disminución de la actividad de dos enzimas dependientes de tiamina en comparación con pacientes cognitivamente sanos y de edad y género (Koh, Charlton, Walton, y McMahon, 2015).

II.6 Tratamientos con PPT

El pirofosfato de tiamina, posee dos fosfatos de alta energía y está involucrado en las reacciones del metabolismo intermedio y la respiración celular, contribuye a la prevención o reducción de la formación de ROS.

La evidencia experimental ha comprobado que el PPT puede disminuir la degeneración causada por el daño oxidativo porque mejora el rendimiento de la respiración aeróbica (Torres et al., 2009; Hernández-Montiel et al. 2014) normaliza los niveles de peroxidación lipídica y es un potente inhibidor de la glicosilación no enzimática además de mejorar los sistemas antioxidantes endógenos como la catalasa (CAT), súper-óxido-dismutasa (SOD) y el sistema glutatión (GSH) (Tolstykh y Khmelevskii, 1991).

En otros reportes se ha encontrado el efecto del PPT sobre características patológicas que se desarrollan en la diabetes y otras enfermedades crónico degenerativas por ejemplo en la retinopatía diabética inducida en ratas, confirmando que el PPT previene la hiperglucemia que provoca la retinopatía diabética en ratas disminuyendo la cantidad de malondialdehído y disminuyendo el estrés oxidativo (Cinici et al., 2016). Por otro lado también se ha probado en hepatotoxicidad donde el PPT evitó el daño oxidativo mejorando los sistemas antioxidantes.

Con relación a las enfermedades neurodegenerativas se ha descrito que incluyen anomalías en el metabolismo de la glucosa y en los sistemas antioxidantes, además de inflamación y el aumento de la generación de ROS. El PPT como potente inhibidor de la peroxidación lipídica, puede llegar a evitar la lipotoxicidad y daño por estrés oxidativo; en el SNC, en donde podría actuar como un tratamiento

que reduzca o retrase el progreso de procesos degenerativos asociados a diferentes factores de riesgo relacionados con el envejecimiento.

Es importante resaltar que lo fundamental del tratamiento con PPT es que es un fármaco noble que puede usarse en conjunto con otros tratamientos sin problemas de interacción farmacológica, además puede utilizarse en la prevención del deterioro cognitivo como una intervención nutricional.

II.7 Modelo triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD)

Los modelos transgénicos para la EA han tenido un papel importante en el entendimiento de la patogénesis de esta enfermedad. A la fecha no se ha desarrollado un modelo que recapitule todos los aspectos de la patología (Lee y Han, 2013; Webster et al., 2014). Siendo el 3xTg-AD, hasta ahora el mejor modelo porque contiene validez histopatológica y de constructo, por su similitud de los mecanismos patológicos en el humano (Bilkei-Gorzo, 2014; Oddo et al., 2003). Porque desarrolla progresivamente amiloidosis y taupatía con un perfil temporal y regional específico, que simula el desarrollo de la EA en el cerebro humano, gracias a que expresa los transgenes humanos PS1-M146V, APP695-Swe y tau-P301L. Fue desarrollado por Oddo y colaboradores, y se logró a partir de la microinyección de los transgenes humanos APP695-Swe y tau-P301L, en embriones de ratones *knockin* para PS1-M146V (Fig. 5).

En el 3xTg-AD se describió que los depósitos de la proteína β A inician en la corteza y progresan al hipocampo con el envejecimiento iniciando las lesiones neuropatológicas que confirman la EA. (Oddo et al., 2003). La detección intracelular de β A es clara desde los 3 m.d.e. en la neocorteza y a los 6 m.d.e. en la región CA1 del hipocampo; a los 9 m.d.e. se confirmó que el modelo comienza a tener agregados intracelulares prominentes en el *subiculum* y la región de CA1, mientras que agregados extracelulares β A son evidentes alrededor de los 11 a 12 m.d.e. en la corteza frontal y otras regiones corticales, así como en el hipocampo.

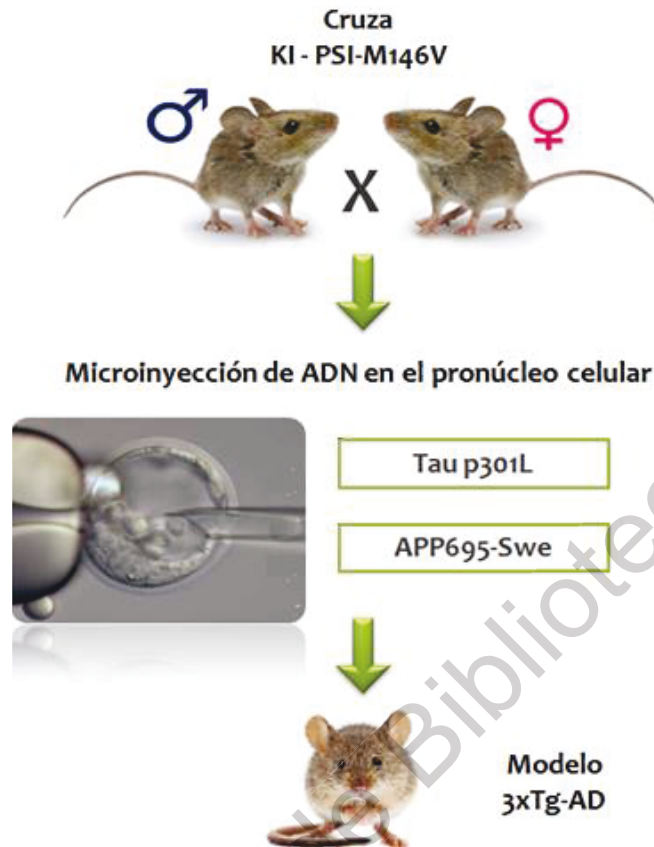


Figura 5. Modelo murino para Alzheimer 3xTg-AD; microinyección de los transgenes humanos PS1-M146V, APP695-Swe y tau-P301L en el pronúcleo de la célula embrionaria, y expresión de las proteínas PPA y tau en diferentes regiones cerebrales. Modificado de Oddo et al. (2003).

De forma paralela, las alteraciones en la proteína tau son notorias en las neuronas piramidales de CA1 a partir de los 12 m.d.e., ambas patologías se desarrollan progresivamente de una manera dependiente de la región cerebral y de la edad (Oddo et al., 2003). Asimismo, se observa proliferación de poblaciones de astrocitos y de microglía en cercanía a los depósitos amiloides conforme la edad y la patología avanzan (Kitazawa et al., 2005; Gimenez-Llort et al., 2007; Mastrangelo y Bowers, 2008).

III. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

III.1 Justificación

La enfermedad de Alzheimer es compleja, multifactorial y progresiva y hasta hoy los tratamientos disponibles no han podido modificar su avance, sin embargo se ha propuesto el uso de fármacos que puedan mejorar la calidad de vida de los pacientes y/o que nos ayuden a entender de mejor manera los mecanismos múltiples por los que la enfermedad origina daño en el SNC y por consecuencia deterioro cognitivo. Dado que el PPT es un cofactor de enzimas limitantes en la producción energética y está directamente involucrado en el mantenimiento del metabolismo intermediario celular; demostrando ser efectivo en el tratamiento del déficit metabólico asociado a estrés oxidativo e inflamación en células somáticas de modelos animales de envejecimiento, retinopatía diabética, obesidad y en humanos que padecen polineuropatía diabética. En el presente trabajo, se diseñó el estudio fundado en el efecto neuroprotector del PPT a nivel cognitivo e histopatológico por un tratamiento de infusión crónica.

III.2 Pregunta de investigación

¿El PPT tendrá capacidad neuroprotectora a nivel cognitivo retrasando su deterioro y/o tendrá un efecto sobre la cantidad de microglía y la disminución de los agregados de β A en un modelo de ratón para la enfermedad de Alzheimer?

IV. HIPÓTESIS

El tratamiento crónico con PPT tendrá un efecto neuroprotector produciendo un retraso en la aparición y/o agregación de la proteína β A y la cantidad de microglía en las áreas de *subiculum* y CA1, modificando las conductas dependientes de hipocampo de ratones 3xTg-AD.

V. OBJETIVOS

V.1 General

Estudiar en el modelo 3xTg-AD el efecto del PPT sobre la respuesta cognitiva, en tareas dependientes de hipocampo, así como el efecto en biomarcadores de β A total y microglía en ratones hembra de 9 m.d.e.

V.2 Particulares

1. Relacionar el efecto del PPT con el desempeño cognitivo en tareas conductuales dependientes de hipocampo.
2. Evaluar el efecto del tratamiento con PPT sobre la cantidad de células microgliales de las áreas de *subiculum* y CA1 del hipocampo.
3. Evaluar por medio de inmunohistoquímica el efecto del PPT sobre la cantidad de agregados de β A total en las áreas de *subiculum* y CA1 hipocampales.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

VI.1 Tipo de Investigación

El diseño del presente estudio es una investigación en ciencia básica de tipo experimental transversal.

VI.2 Población

El desarrollo experimental se llevó a cabo bajo las normas internacionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio establecidas por el National Research Council (2010). Asimismo, el protocolo que se siguió fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología (INB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Ratones hembras 3xTg-AD homocigotos de 9 m.d.e. generados a partir de un fondo híbrido B6129S (n=10), así como los sujetos control no transgénicos de la misma edad y sexo fueron mantenidos bajo el mismo fondo híbrido B6129S (n=10).

Todos los sujetos fueron criados y reproducidos en el bioterio del INB UNAM, en cajas de policarbonato (12x12x25 cm) y en condiciones óptimas de alimentación (dieta para ratón del laboratorio Purina Chow formula 5001 y agua *ad libitum*) y de ambientación constante (temperatura entre 20°-25°C; humedad 40-70%) en un ciclo de luz/oscuridad de 12hrs, iniciándose a las 8:00 pm y en monitoreo riguroso.

VI.3 Implantación de bombas osmóticas y grupos experimentales

Para evitar sesgos en la experimentación se manejó un protocolo doble ciego, con claves alfanuméricas desconocidas para los experimentadores a lo largo de todo el proceso experimental, desde el procedimiento quirúrgico hasta la tarea conductual y el análisis inmunohistoquímico.

Para los tratamientos con PPT, en una dosis de 2mg/kg/día se hizo una solución stock en la que se mezclaron el PPT y la solución salina. Para los tratamientos vehículo se administró sólo solución salina. Se emplearon cuatro grupos experimentales: transgénicos tratados con el PPT (TG PPT, n=4), transgénicos tratados con solución vehículo (TG VHCL, n=2) y ratones no transgénicos con el mismo tratamiento usados como control (NoTG PPT n=12, NoTG VHCL n=14).

Se realizó una cirugía de 3cm a nivel del plano medio dorsal, posterior a esto se separó la piel del músculo y se insertó la bomba debajo de la piel, para finalizar se suturó la herida. La bomba implantada contenía el PPT o la solución vehículo respectivamente.

Para la cirugía, se anestesió a los animales usando una mezcla de ketamina y xilacina en una proporción 70:30 en una dosis de 70mg/kg y 6mg/kg del fármaco correspondiente. La administración del fármaco se llevó a cabo utilizando bombas osmóticas (modelo 2006, Alzet, Durect).

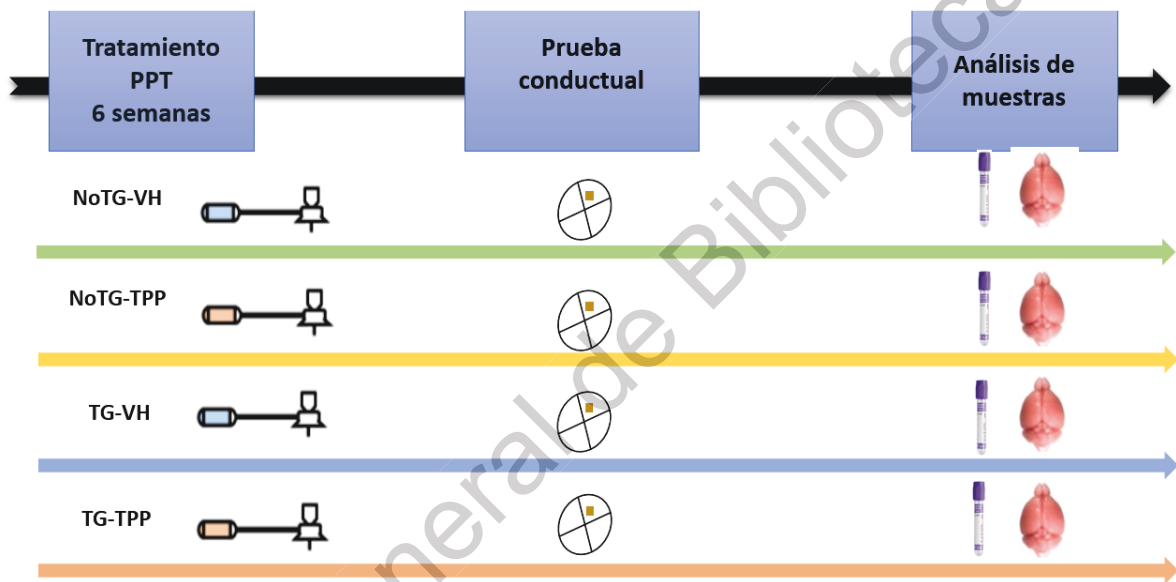


Figura 6. Diseño experimental. Ratones hembras de 9 m.d.e. 3xTg-AD fueron tratados con 100 μ l solución salina (vehículo) o con 2mg/kg/día de PPT en 100 μ l solución salina durante 6 semanas usando bombas osmóticas implantadas de forma subdérmica. Como grupo control se contó con dos grupos de ratones no-transgénicos de la misma edad y sexo bajo las mismas condiciones de tratamiento. Después de la última semana de tratamiento, los cuatro grupos experimentales realizaron la tarea del LAM. Dos días después de finalizar las pruebas conductuales, se sacrificó a los animales para obtener los tejidos cerebrales. Modificado de Mancilla-Pérez (2017).

VI.4 Conducta

La tarea de construcción del nido se evaluó en la última semana de tratamiento después de la manipulación de los animales y previo a la tarea del LAM. Esta prueba se realizó como la describe (Deacon, 2012), utilizando algodón plisado de 5 x 5 cm. Se adaptaron durante una semana en ciclo invertido de luz/oscuridad.

Posteriormente, se colocaron en jaulas individuales 2 días previos a la colocación del algodón, que fue a las 11 am (una hora después del inicio del ciclo al apagarse la luz). A las 12 horas, se evaluaron sus habilidades para hacer nidos, bajo un protocolo de ciego para evitar sesgos tomando en cuenta las puntuaciones del 1 al 5, siguiendo los criterios de Deacon.

La tarea del laberinto acuático de Morris (LAM) fue aplicada en la semana consecutiva al final del tratamiento en la semana 7 (Fig. 6). El método y parámetros a evaluar en esta prueba se basaron en los protocolos de Vorhees y Williams (Vorhees y Williams, 2006). El aparato utilizado consistió en un tanque circular (1 metro de diámetro y 40 cm de alto) blanco a una distancia de 80 cm del suelo, lleno de agua mezclada con pintura témpera del mismo color del tanque, a una temperatura entre 21-23° C. Se designaron 2 ejes principales perpendiculares entre sí, creando una forma de "+". El final de cada línea marcó los cuatro puntos de inicio, dividiendo el área en cuatro cuadrantes iguales. Asimismo, se colocaron claves extra-laberinto de diferentes formas y colores, distribuidas en las paredes de la habitación donde se realizó la tarea, las cuales se mantuvieron en el mismo lugar durante todos los ensayos (Fig. 7). Los ratones fueron entrenados para nadar hacia una plataforma de acrílico transparente (8 x 8 cm de lado y 15 cm de alto) sumergida a 1.5 cm debajo de la superficie del agua e invisible para los ratones mientras nadaban. La localización de la plataforma fue seleccionada al azar para cada ratón en medio de uno de los cuatro cuadrantes, pero fue constante para cada individuo durante el entrenamiento. En cada sesión de adquisición, el ratón se colocó en el tanque en uno de los cuatro puntos de inicio en un orden semi-aleatorio.

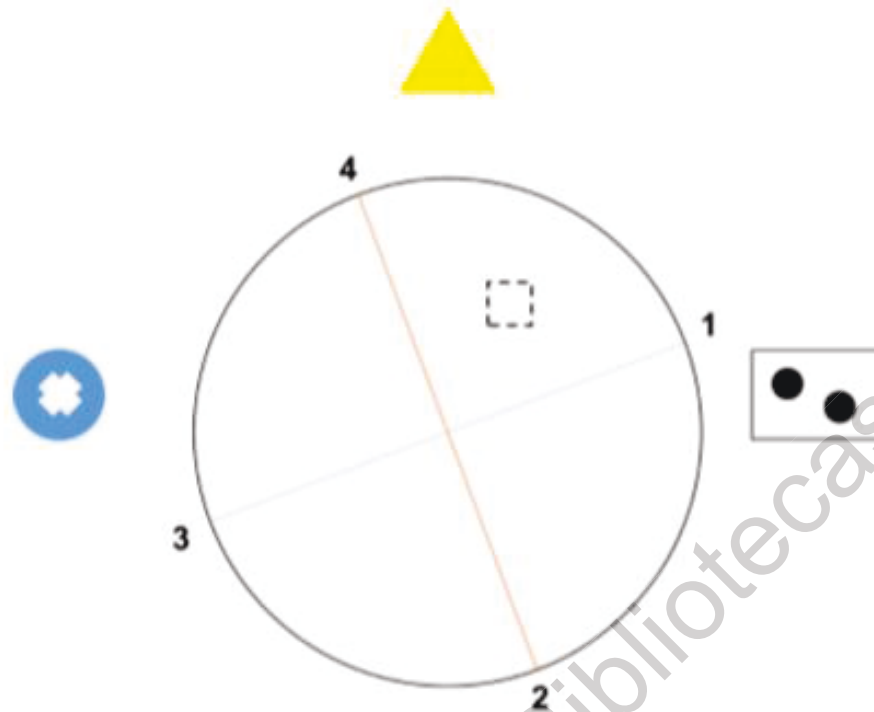


Figura 7. Plano del tanque para LAM donde se representan los cuatro cuadrantes (limitados por las líneas azul y roja) y los puntos de inicio de las pruebas (marcados por los números). Asimismo, se simboliza la ubicación de la plataforma sumergida (línea de guiones) y la forma y colores de algunas claves extra-laberinto Tomado de Mancilla-Pérez (2017).

Se permitió al ratón encontrar y escapar a la plataforma sumergida (latencia de escape(s)). Una vez hecho esto, se dejaron por 20 segundos sobre ésta. En casos donde el sujeto no lograba encontrar la plataforma en 60 segundos, era manualmente guiado a la plataforma y se ponía sobre ésta por 20 segundos. Cada individuo realizó 4 sesiones por 4 días en total. Antes de la primera sesión de entrenamiento, se colocó a los animales directamente sobre la plataforma durante 10 segundos a fin de reducir el estrés relacionado a la tarea.

Los sujetos fueron sometidos a cuatro días de adquisición. Esta prueba consistía en nado libre por 60 segundos en el tanque con la plataforma. El sujeto fue colocado de forma aleatoria desde cuatro diferentes puntos desde la posición en donde se encontraba la plataforma. El parámetro medido en esta prueba fue la

latencia de escape en segundos, a la localización donde se encontraba de la plataforma.

Todas las pruebas fueron analizadas con el software SMART Video Traking System (Panlab Harvard Apparatus), con el cual también se definieron los perímetros, los cuadrantes y las locaciones de la plataforma.

VI.6 Procesamiento del tejido

Transcurridos los días de los diferentes tratamientos, los ratones de las diferentes condiciones experimentales fueron anestesiados por administración de dosis letal de pentobarbital sódico (0.22ml/kg) y fijados por perfusión cardiaca con una solución de paraformaldehído al 4% (PFA 4%) en solución salina amortiguada por fosfatos al 0.1 M (PBS 0.1 M) pH 7.4. Los cerebros fueron retirados inmediatamente y seccionados de forma sagital para dividir los hemisferios cerebrales. Luego de 24 horas de pos fijación en PFA 4% los tejidos fueron cambiados a una solución de sacarosa al 30% por 48 horas para ser cortados por congelación en criostato (Leica Biosystems), sagitalmente a 40 μ m de grosor.

VI.7 Anticuerpos

Para detectar la microglía se utilizó un anticuerpo policlonal producido en cabra (Iba-1; 1:500; abcam, ab107159) que reconoce las moléculas de enlace a calcio ionizado que se expresan en microglía (Ito et al., 1998).

Para observar las placas de la proteína β A se empleó un anticuerpo monoclonal producido en ratón (bam-10; 1:500; ThermoFisher, MA1-91209) que está dirigido a los fragmentos de β A 40-43 (M. Liu et al., 2018).

Anticuerpos secundarios biotinilados; un anti-ratón para hacer una amplificación con el sistema Avidina y Biotina (Biotinylated Horse Anti-Mouse IgG Antibody; 1:500; Vector Labs, BA-2000) y un anti-cabra (Biotinylated Horse Anti-Goat IgG Antibody; 1:500; Vector Labs, BP-9500).

Sistema Avidina y Biotina (A+B) para realizar un método inmunohistoquímico indirecto y amplificar la señal del anticuerpo secundario (VECTASTAIN ABC systems; 50:2500; Vector Labs, PK-6100).

Sistema diaminobencidina (DAB) que se une al A+B, el cual se oxida al agregar glucosa oxidasa y se precipita dando lugar a la marca del anticuerpo secundario que reconoció al primario.

VI.8 Inmunohistoquímica

Se seleccionaron de 4 a 5 cortes del hemisferio izquierdo de cada animal entre las coordenadas 1.92 mm y 0.96 mm laterales a la línea media de acuerdo al atlas de cerebro de ratón (Franklin y Paxinos, 2001). A continuación, fueron lavados en flotación libre en PBS 0.1 M por 10 min, y luego incubadas en buffer de citratos a 80-100° C por 20 min para exponer los epítopes, seguido de tres lavados de 10 min cada uno en PBS 0.1 M. Las secciones fueron permeabilizadas con 0.05% de Tritón-20 PBS 0.1 M (PBS-T) por 15 min.

Los anticuerpos primarios; BAM10 (1:500) e Iba-1 (1:500) fueron diluidos en PBS-T y se incubaron los tejidos toda la noche en agitación a 4° C. Los tejidos fueron lavados con PBS en tres ocasiones 10 min cada una a temperatura ambiente. Hecho esto, se aplicaron los anticuerpos biotinilados correspondientes por 2hrs seguido del sistema A+B por 30min. Se realizaron tres lavados de 10min en PBS. Finalmente se procedió a revelar la marca de los anticuerpos con el sistema DAB y glucosa oxidasa.

Finalmente, los cortes fueron montados en PBS 0.05 M en cubreobjetos, una vez que se secaron se procedió a realizar la tinción de Nissl para finalmente ser deshidratados en xilol y cubiertos en resina de montaje.

VI.9 Microscopia y análisis de imagen

Las imágenes de inmunohistoquímica enzimática (Iba-1, BAM10) fueron obtenidas de dos campos de los tejidos que fueron procesados, la región del *subículum* en el límite con CA1 y la región de CA1 contigua inmediata a la primera. Se capturó usando un microscopio Nikon modelo Eclipse CiE, mediante el software NIS-Elements Viewer. Para el análisis de las fotografías se usó el software de procesamiento de imagen Image J (National Institutes of Health). Para el conteo

celular se tomaron en cuenta las células que tuvieran bien definidos el soma y los procesos, mientras que para la evaluación de acumulados de proteína se utilizó un contraste y se midió el área de la marca de amiloide, esto se llevó a cabo utilizando el programa Image J utilizando la función *multi-point* y *black and white (threshold)* para poder marcar simultáneamente el área total de contraste y las células de toda el área de interés (*subiculum* y CA1), por cada imagen se obtuvo el número total de células por área. Las imágenes se analizaron bajo un protocolo de ciego para evitar sesgos en la obtención de la información. Dichos valores se compararon estadísticamente entre grupos.

VI.10 Análisis estadístico

La normalidad de los datos fueron evaluados usando la prueba de Shapiro-Wilk. Dado que los valores no presentaron una distribución normal debido a que el número de muestras del grupo TG VHCL era muy pequeño, se aplicaron las pruebas no-paramétricas de Kruskal-Wallis (K-W), para grupos independientes, y de Friedman, para medidas repetidas. Los resultados fueron considerados significativos cuando $P < 0.05$ para las pruebas de conducta y en los análisis de imagen. Los análisis estadísticos y los gráficos de la tarea conductual y del análisis de imagen fueron realizados en el programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software).

VII. RESULTADOS

VII. 1 El PPT rescata la función innata de construcción del nido

Para probar el efecto neuroprotector del PPT a nivel cognitivo se llevó a cabo la tarea innata de construcción del nido, esta conducta es común en hembras y machos ya que tiene como propósito principal la termorregulación además de estar asociada con la reproducción, la mayoría de los ratones control de cepa no transgénica obtienen puntuaciones de 4-5, pero cuando se lesiona el hipocampo la puntuación media oscila entre 1-2. Nosotros observamos que no existen diferencias significativas entre los grupos control y nuestro grupo tratado con PPT, por lo cual podemos inferir que el PPT tuvo un efecto sobre la función del hipocampo.

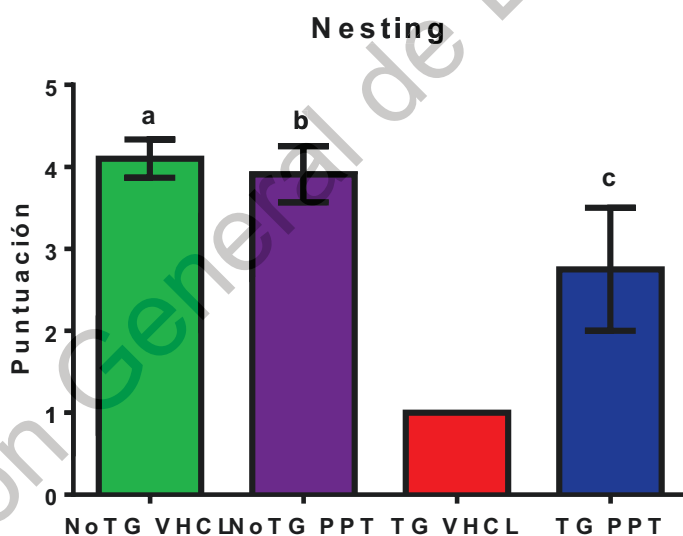


Figura 8. Puntuación de la tarea de nesting. No hay diferencias significativas entre las puntuaciones de los grupos NoTG VHCL (n=10), NoTG PPT (n=10) y TG PPT (n=4), lo que nos indica que el grupo TG PPT tuvo un retraso en el daño ocasionado en este modelo a los 11m.d.e. Sin embargo el grupo TG VHCL (n=2) obtuvo las puntuaciones más bajas en la tarea de construcción del nido. a,b,c Kruskal-Wallis ($P < 0.05$), Post Hoc Dunn (ns).

VII.2 El PPT mejora la adquisición en la tarea de LAM en los ratones 3xTg-AD

Para probar la mejora de la conducta espacial dependiente de hipocampo en los ratones 3xTg-AD, se evaluó la adquisición en la tarea de LAM. El análisis entre los grupos mostró diferencias significativas para el cuarto día de entrenamiento, siendo los grupos NoTG y TG PPT los que adquirieron la conducta exponiendo latencias de escape más cortas con respecto al primer día de entrenamiento (Fig. 9). El grupo TG VHCL a pesar de sólo tener dos individuos muestra una conducta congruente con el deterioro cognitivo e incapacidad para la prueba de LAM reportada en el modelo 3xTg-AD para esta edad.

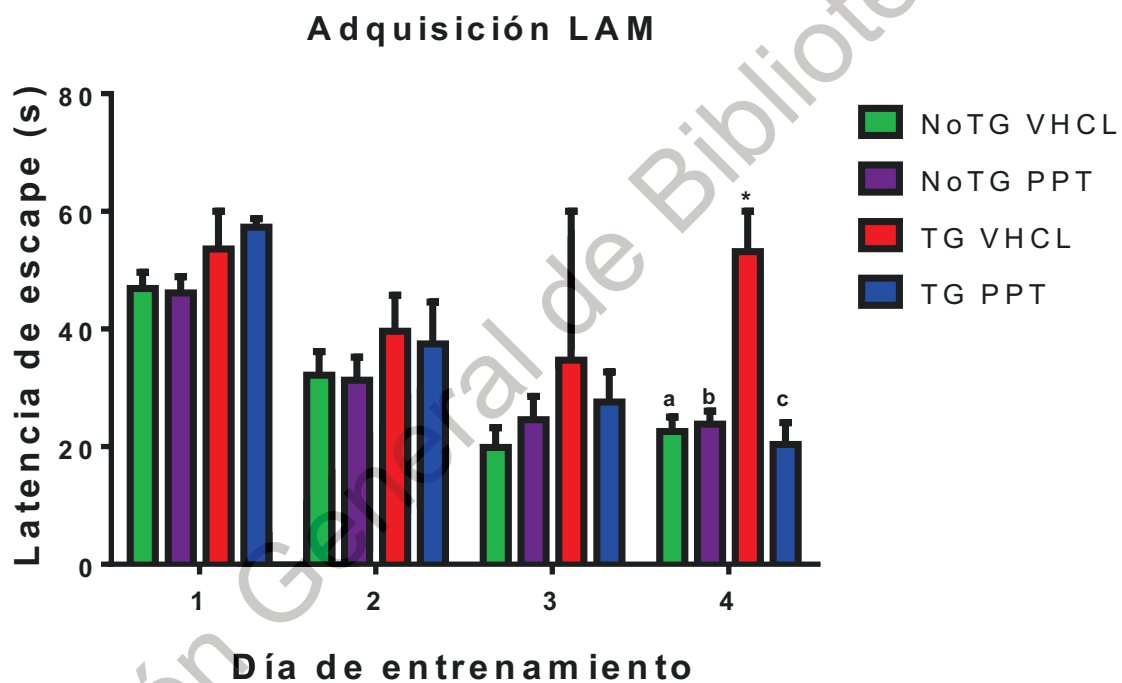


Figura 9. Adquisición de la tarea de LAM. Los grupos NoTG (n=14,12) junto con el grupo TG PPT tuvieron diferencias significativas en la reducción de la latencia de escape en el cuarto día con respecto al primer día de entrenamiento. Kruskal-Wallis ($P < 0.05$), Friedman ($P < 0.05$) Post Hoc Dunn ($P < 0.05$).

VII.3 Disminución de BA total por efecto del PPT

Para comprobar que el PPT tenía un efecto a nivel de tejido en las áreas de *subiculum* y CA1 del hipocampo medimos por medio de análisis inmunohistoquímica la cantidad de β A total usando el biomarcador BAM10 encontrando diferencias significativas entre los grupos TG VHCL y TG PPT. Esto es importante porque la deposición de la proteína β A en la enfermedad de Alzheimer sigue siendo el biomarcador fundamental para sospechar un diagnóstico de la patología, aunque este no sea el disparador de los eventos neurodegenerativos, debemos tomar en cuenta su contribución a lo largo del continuo biológico multifactorial que representa la EA, por lo cual tratamientos que puedan modular o retrasar de alguna manera la proteinopatía pueden ser de gran utilidad.

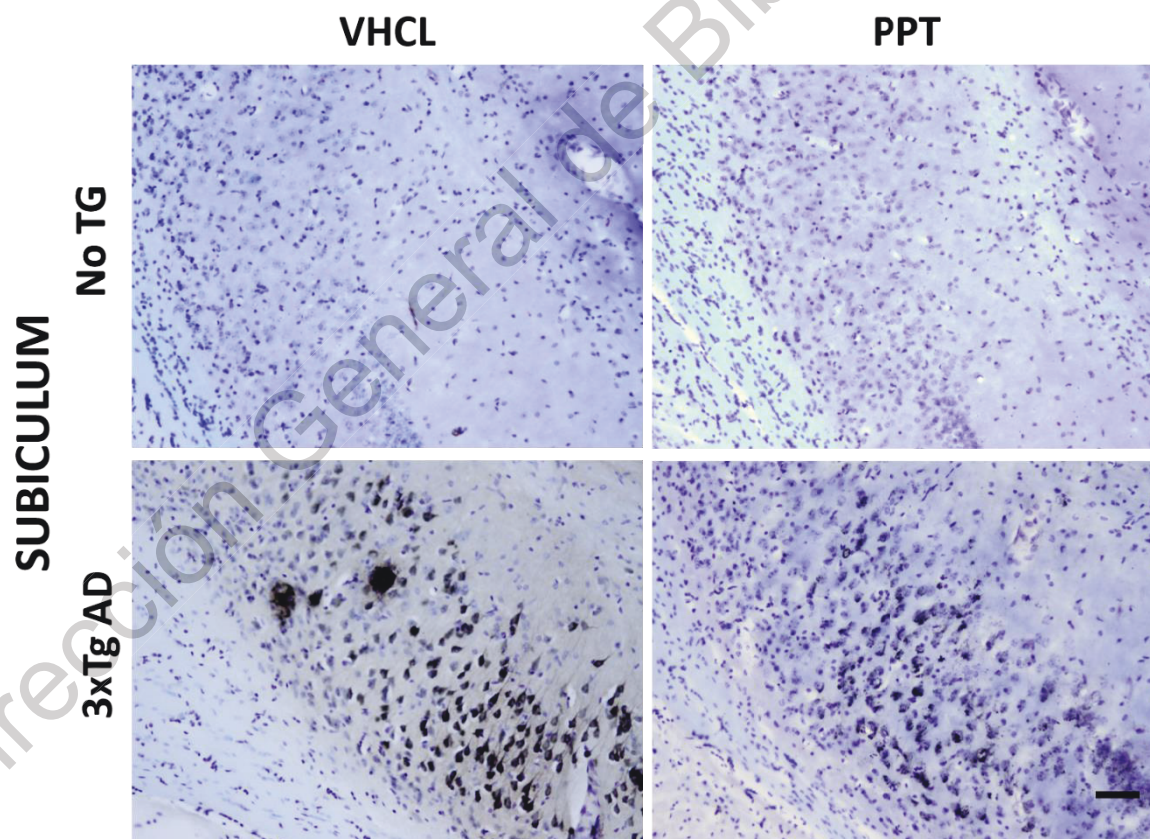


Figura 10. Fotomicrografías de la inmunohistoquímica enzimática de BAM10. Se muestran imágenes representativas del área de subiculum de los cuatro grupos experimentales NoTG VHCL (n=4), NoTG PPT (n=4), TG VHCL (n=4) y TG PPT (n=4). Se observan diferencias

cualitativas entre las condiciones genéticas verticalmente y entre tratamientos horizontalmente. Barra equivalente a 50 μ m.

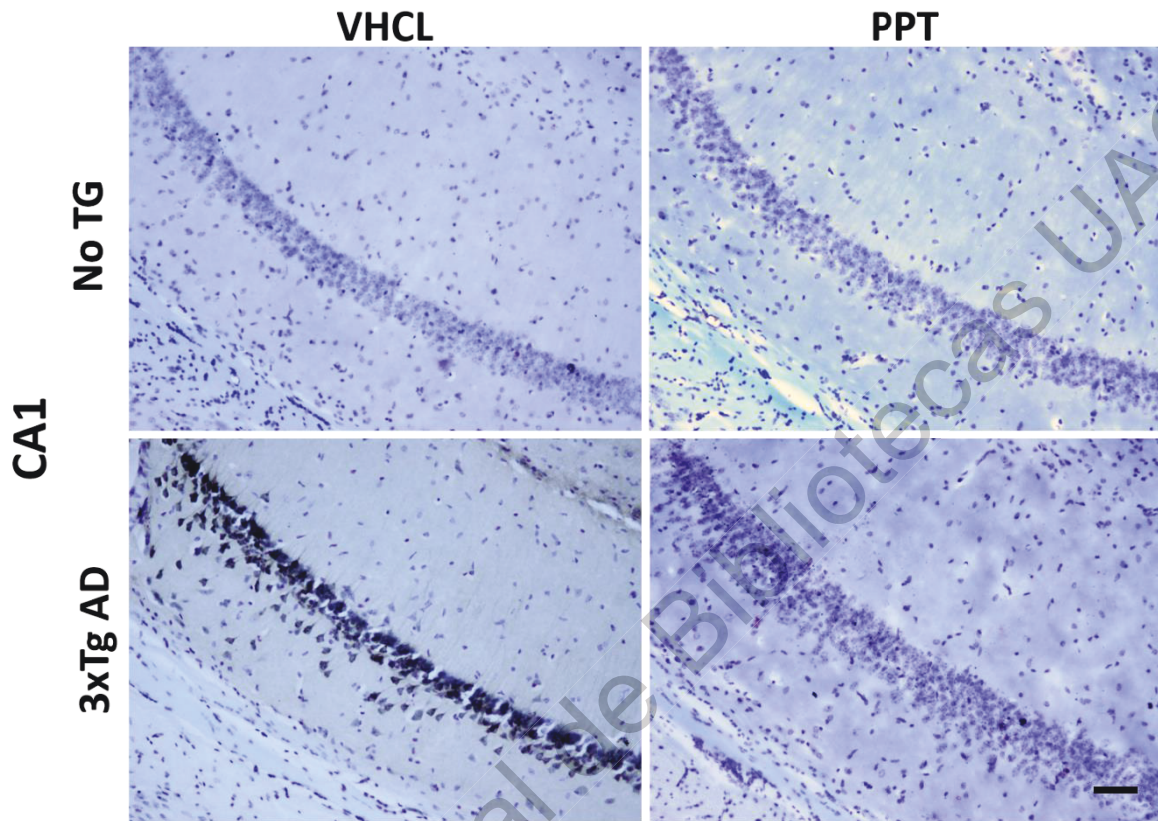


Figura 11. Fotomicrografías de la inmunohistoquímica enzimática de BAM10. Se muestran imágenes representativas de la región de CA1 en planos equivalentes y equidistantes de los cuatro grupos experimentales NoTG VHCL (n=4), NoTG PPT (n=4), TG VHCL (n=4) y TG PPT (n=4). Se observan diferencias cualitativas entre las condiciones genéticas verticalmente y entre tratamientos horizontalmente. Barra equivalente a 50 μ m.

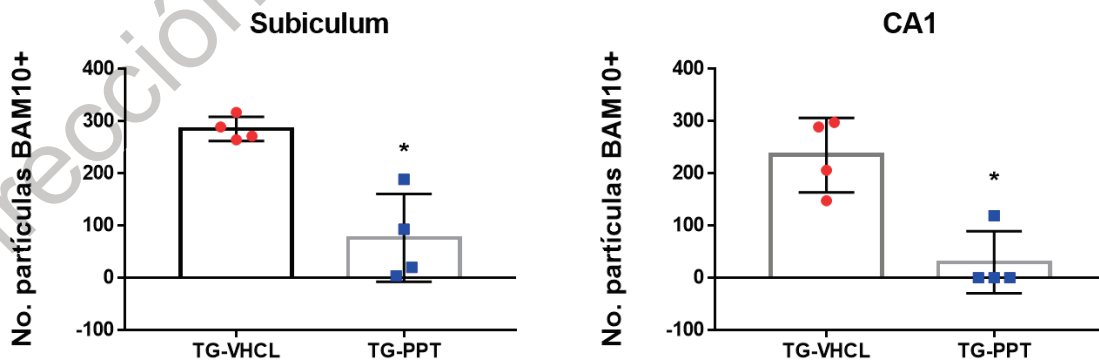


Figura 12. Número de partículas de BAM10+ por área. Se muestra una reducción significativa en la agregación de placas en el grupo TG PPT, lo que confirma los cambios observados a nivel histológico y cualitativo.

VII.4 Cantidad de células microgliales y efecto del PPT

La neuroinflamación en la EA se puede definir como un cambio en el número de células microgliales, que inducen la producción de factores como NO, EROs, citocinas pro-inflamatorias y prostaglandinas que promueven la neurodegeneración. La microglía regulan la respuesta inmune y su homeostasis, sin embargo no encontramos cambios significativos entre los diferentes grupos de tratamiento, sería interesante observar la morfología celular y biomarcadores específicos para neuroinflamación para obtener más información acerca de los mecanismos fisiológicos que están involucrados en la interacción del tratamiento con PPT, la agregación de β A y la función de las células microgliales.

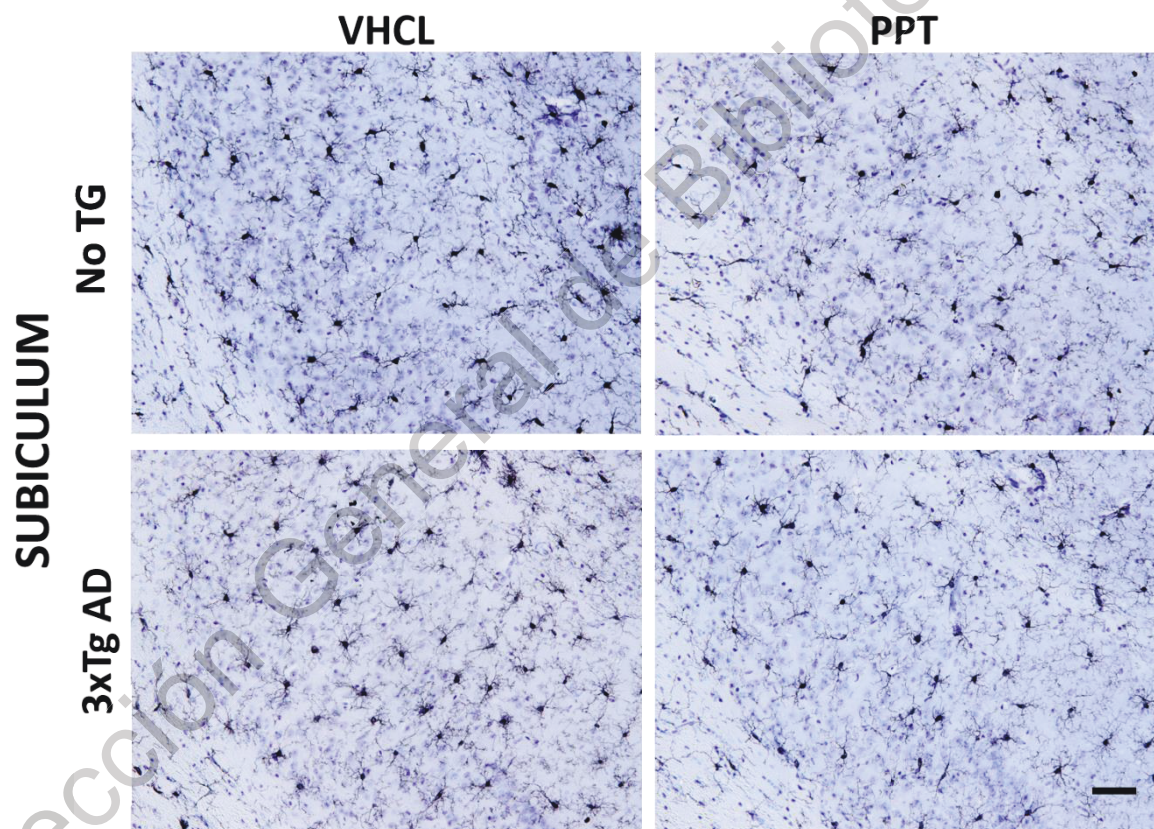


Figura 13. Fotomicrografías de la inmunohistoquímica enzimática de Iba-1. Se muestran imágenes representativas del área de *subiculum* de los cuatro grupos experimentales NoTG VHCL (n=4), NoTG PPT (n=4), TG VHCL (n=4) y TG PPT (n=4). Se observan diferencias cualitativas entre las condiciones genéticas verticalmente y entre tratamientos horizontalmente. Barra equivalente a 50 μ m.

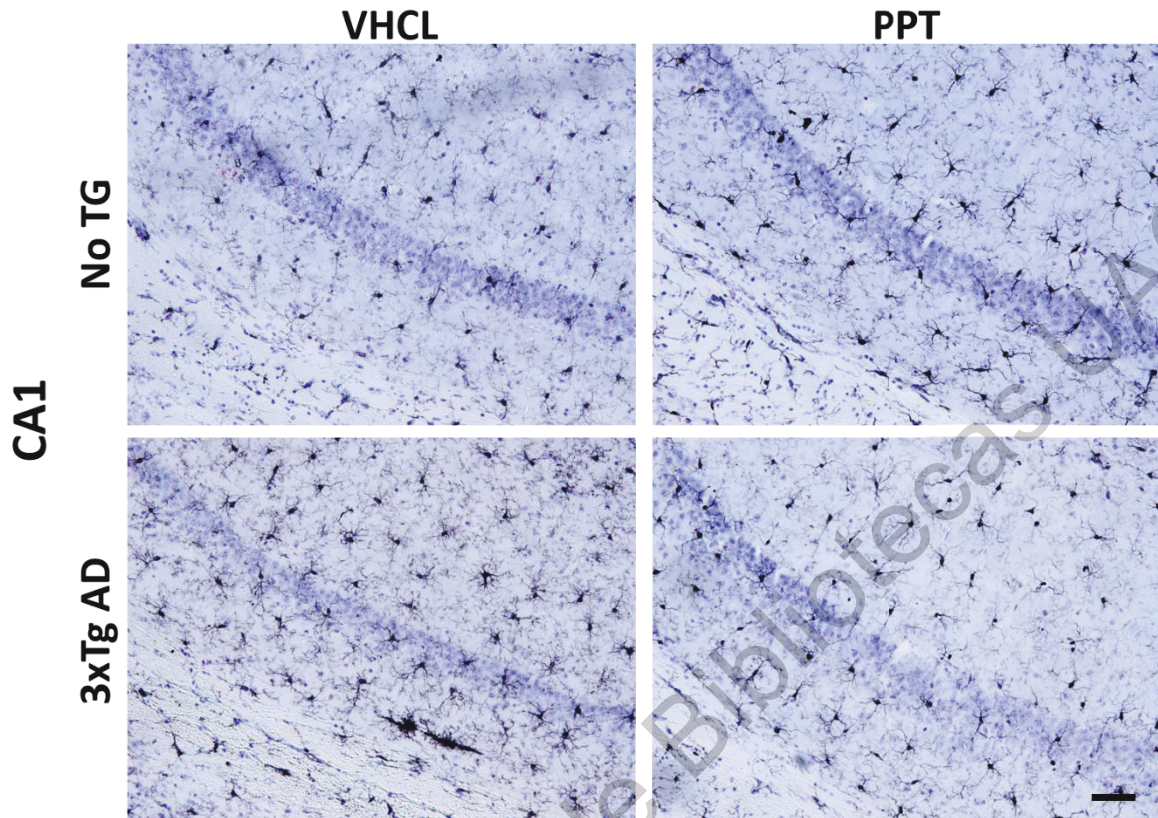


Figura 14. Fotomicrografías de la inmunohistoquímica enzimática de Iba-1. Se muestran imágenes representativas del área de CA1 de los cuatro grupos experimentales NoTG VHCL (n=4), NoTG PPT (n=4), TG VHCL (n=4) y TG PPT (n=4). Se observan diferencias cualitativas entre las condiciones genéticas verticalmente y entre tratamientos horizontalmente. Barra equivalente a 50 μ m.

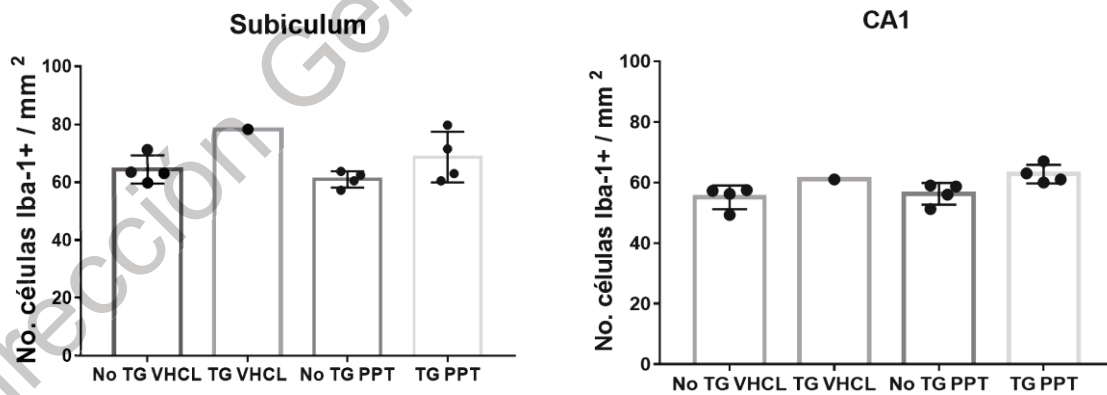


Figura 15. Número de células positivas a Iba-1. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos (n= 4).

VIII. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento crónico con PPT tuvo un efecto sobre la conducta mejorando la curva de adquisición donde se observaron diferencias significativas en las latencias de escape del día 1 al día 4 en los grupos NoTG (n<10) y TG PPT (n=4) con respecto al grupo TG VHCL (n=2) que no logró la fase de adquisición de la conducta de LAM, aunque cabe mencionar que la cantidad de animales para este grupo es pequeña, sin embargo es importante notar que el grupo TG PPT se comportó de manera similar a los grupos de condición genética control (Fig. X)...

De acuerdo a la hipótesis planteada, el grupo de animales TG PPT tuvo un mejor desempeño en la prueba de adquisición de LAM dependiente de la región hipocampal dorsal (Vorhees y Williams, 2006), misma región que se ve severamente afectada en el modelo 3xTg-AD (Billings, Oddo, Green, McGaugh y LaFerla, 2005; Clinton et al., 2007). En este estudio se valoró la reducción del tiempo de escape a la plataforma en el LAM durante la fase de adquisición, en donde la llegada del sujeto a la plataforma en un tiempo determinado (60 seg) permite evaluar su aprendizaje (Vorhees y Williams, 2006; Bromley-Brits, Deng y Song, 2011). El desempeño en esta tarea se ve alterado en el grupo tratado con la solución vehículo TG VHCL por la manifestación de la patología, el deterioro cerebral y el depósito de la proteína β A que interfiere con la comunicación sináptica (Morin et al., 2016). Además con base en reportes previos de otros autores, desde los 10-11 m.d.e. ya es notable que el desempeño conductual del ratón 3xTg-AD se vuelve insuficiente para realizar la tarea de LAM durante la fase de aprendizaje y más aún en la fase de memoria de largo plazo o retención (Billings et al., 2007; Peng et al., 2012). Estos resultados son comparables con trabajos hechos anteriormente por el grupo de Frydman-Marom donde se aplicó un tratamiento con un dipéptido que tiene la propiedad de romper los agregados β A ocasionando que el deterioro cerebral de los ratones se retarde y asimismo se observa una mejora en la adquisición en prueba conductual del LAM (Frydman-Marom et al., 2009). Por otra parte, no encontramos diferencias en la cantidad de células microgliales por mm² en la áreas de subíulum y CA1 en el grupo TG PPT (Fig.14), lo cual podría estar relacionado

con un mantenimiento en el metabolismo celular y por lo tanto una mayor actividad de estas células, se propone que en futuros trabajos se analice la morfología que también podría brindar información acerca del estado histopatológico del tejido cerebral (Schwartz et al., 2006). Además, se ha reportado que uno de los mecanismos de protección por los que actúa la microglía es por medio de la activación de factores de transcripción y la expresión de la iNOS (Förstermann y Sessa, 2012) y por medio de esta enzima produce óxido nítrico, molécula que generada de manera recurrente ocasiona un desbalance de EROs y ERNs provocando daños en las células y cambios postraduccionales en proteínas cuando el proceso se da de manera crónica (Li, Baud, et al., 2005) por lo que se necesitan hacer más análisis histológicos y de cuantificación protéica para obtener conclusiones más claras sobre el efecto del PPT en la población de células microgliales.

Por los resultados de otras investigaciones se sabe que como parte de la neuroinflamación hay un aumento en la población de células microgliales no sólo en el modelo 3xTg-AD a los 12 y 18 m.d.e., sino también en muestras de cerebros humanos con la EA en el área de CA1 del hipocampo (Rodriguez et al., 2010; Rodriguez et al., 2013), esto sugiere que la neuroinflamación es un proceso importante que forma parte del círculo vicioso de la agregación de la proteína β A, el daño neuronal, el estrés nitro-oxidativo y la degeneración durante la EA (Calsolaro y Edison, 2016), de manera similar a estos trabajos encontramos un aumento de la cantidad de células microgliales en el área de *subiculum* y CA1 lo que se relaciona con la edad y el desarrollo de la patología amiloide en el hipocampo del modelo 3xTg-AD tratado con PPT.

Se sabe que la microglía puede ser activada por patrones moleculares asociados a patógenos y señales endógenas de "peligro", liberados de las células que alertan al sistema inmune innato y activan varias vías de traducción de señales que inducen cascadas proinflamatorias y activan la formación del inflammasoma, mediando la liberación de citocinas. En este sentido, la proteína β A podría activar la respuesta inmune innata durante el curso de la EA (Akiyama et al., 2000; Venegas y Heneka, 2017). Por lo reportado en la presente tesis, sobre la cantidad de

microglía podríamos inferir que el PPT está teniendo un efecto sobre la microglía cerebral en el 3xTg-AD, y a pesar de que en este trabajo no se evalúa el cómo, es probable que uno de los mecanismos se base en la activación de los patrones moleculares asociados a patógenos y señales endógenas, puesto que la proteína β A puede ser reconocida como este tipo de señal por la microglía induciendo un estado de activación microglial.

Falta enriquecer estos estudios para la obtención de datos más concluyentes pero puede funcionar como una herramienta en el tratamiento de la enfermedad herramienta química multifuncional para el estudio de los mecanismos patológicos en la EA, aunado a esto hace falta determinar con más pruebas y biomarcadores su multifuncionalidad.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

IX. CONCLUSIONES

- El tratamiento crónico de infusión subdérmica con PPT es capaz de mejorar la adquisición en la prueba dependiente de hipocampo LAM en ratones 3xTg-AD.
- El PPT disminuyó de manera significativa la cantidad de partículas de β A total en las áreas de *subiculum* y CA1 de los ratones 3xTg-AD.
- Falta tener un número más completo de animales y realizar más pruebas con diferentes biomarcadores que nos ayuden a entender los mecanismos por los cuales el PPT está actuando sobre el metabolismo de β A y posiblemente ralentizar el deterioro cognitivo en este modelo.
- El PPT puede formar parte de un tratamiento compuesto en el que se ataque desde diferentes puntos de vista la multifactorialidad de la enfermedad de Alzheimer.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Agostinho, P., A Cunha, R., y Oliveira, C. (2010). Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Current Pharmaceutical Design*, 16(25), 2766–2778.
- Akira, S. (2003). Toll-like receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 38105–38108.
- Akiyama, H., Arai, T., Kondo, H., Tanno, E., Haga, C., y Ikeda, K. (2000). Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain. *Alzheimer Disease & Associated Disorders*, 14(1), S47–S53.
- Alzheimer, A. (2006). Concerning a unique disease of the cerebral cortex. In *Alzheimer: 100 Years and Beyond* (pp. 3–11). Springer.
- Banka, S., de Goede, C., Yue, W. W., Morris, A. A. M., Von Bremen, B., Chandler, K. E., ... others. (2014). Expanding the clinical and molecular spectrum of thiamine pyrophosphokinase deficiency: a treatable neurological disorder caused by TPK1 mutations. *Molecular Genetics and Metabolism*, 113(4), 301–306.
- Barnham, K. J., Masters, C. L., Bush, A. I. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(3), 205–214.
- Barrow, C. J., & Small, D. H. (2007). *Abeta Peptide and Alzheimer's Disease*. Springer.
- Beck, M. W., Oh, S. B., Kerr, R. A., Lee, H. J., Kim, S. H., Kim, S., ... Lim, M. H. (2015). A rationally designed small molecule for identifying an in vivo link between metal–amyloid- β complexes and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Chemical Science*, 6(3), 1879–1886.
- Bennett, D. A. (2017). Mixed pathologies and neural reserve: Implications of complexity for Alzheimer disease drug discovery. *PLoS Medicine*, 14(3), e1002256.
- Berk, C., Paul, G., y Sabbagh, M. (2014). Investigational drugs in Alzheimer's disease: current progress. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 23(6), 837–846.
- Bilkei-Gorzo, A. (2014). Genetic mouse models of brain ageing and Alzheimer's

- disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 142(2), 244–257.
- Bush, A. I. (2003). The metallobiology of Alzheimer's disease. *Trends in Neurosciences*, 26(4), 207–214.
- Calsolaro, V., y Edison, P. (2016). Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimers & Dementia*, 12(6), 719–732. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.02.010>
- Cherry, J. D., Olschowka, J. a, y O'Banion, M. K. (2014). Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *Journal of Neuroinflammation*, 11(1), 98. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-98>
- Choi, J.-S., Braymer, J. J., Nanga, R. P. R., Ramamoorthy, A., y Lim, M. H. (2010). Design of small molecules that target metal-A β species and regulate metal-induced A β aggregation and neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(51), 21990–21995.
- Cole, L., Kramer, P. R., Henry, W., Querfurth, H. W., y LaFerla, F. M. (2010). Mechanisms of disease Alzheimer's disease. *New Engl J Med*, 362, 329–344. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803699-0.00045-1>
- council, N. R., y otros. (2010). *Guide for the care and use of laboratory animals*. National Academies Press.
- Deacon, R. (2012). Assessing burrowing, nest construction, and hoarding in mice. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (59), e2607.
- Donnelly, P. S., Xiao, Z., y Wedd, A. G. (2007). Copper and Alzheimer's disease. *Current Opinion in Chemical Biology*, 11(2), 128–133.
- Gibson, E. L., y Green, M. W. (2002). Nutritional influences on cognitive function: Mechanisms of susceptibility. *Nutrition Research Reviews*, 15(1), 169–206.
- Gibson, G. E., y Blass, J. P. (2007). Thiamine-dependent processes and treatment strategies in neurodegeneration. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9(10), 1605–1620.
- Gibson, G. E., Hirsch, J. A., Cirio, R. T., Jordan, B. D., Fonzetti, P., y Elder, J. (2013). Abnormal thiamine-dependent processes in Alzheimer's Disease. Lessons from diabetes. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 55, 17–25.
- Gimenez-Llort, L., Blazquez, G., Canete, T., Johansson, B., Oddo, S., Tobena, A.,

- ... Fernandez-Teruel, A. (2007). Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: a role for intraneuronal amyloid. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 31(1), 125–147.
- Glabe, C., y Bush, A. I. (2007). A β Structure and Aggregation. In *Alzheimer's Disease* (pp. 113–131). Springer.
- Glasø, M., Nordbø, G., Diep, L., y Bøhmer, T. (2004). Reduced concentrations of several vitamins in normal weight patients with late-onset dementia of the Alzheimer type without vascular disease. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 8(5), 407–413.
- Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C., y Gage, F. H. (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, 140(6), 918–934.
- Goate, A., Owen, M., James, L., Mullan, M., Rossor, M., Haynes, A., ... others. (1989). Predisposing locus for Alzheimer's disease on chromosome 21. *The Lancet*, 333(8634), 352–355.
- Goedert, M., y Spillantini, M. G. (2006). A century of Alzheimer's disease. *Science*, 314(5800), 777–781.
- Gouras, G. K., Tsai, J., Naslund, J., Vincent, B., Edgar, M., Checler, F., ... others. (2000). Intraneuronal A β 42 accumulation in human brain. *The American Journal of Pathology*, 156(1), 15–20.
- Gutierrez-Robledo, L. M., y Arrieta-Cruz, I. (2015). Dementia in Mexico: The need for a national Alzheimer s plan. *Gac Med Mex*, 151, 667–673.
- Hanisch, U.-K., y Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neuroscience*, 10(11), 1387–1394. <https://doi.org/10.1038/nn1997>
- Hardy, J. A., y Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256(5054), 184.
- Hardy, J., y Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5580), 353–356. <https://doi.org/10.1126/science.1072994>
- Herholz, K., Carter, S. F., y Jones, M. (2007). Positron emission tomography imaging

- in dementia. *The British Journal of Radiology*, 80(special_issue_2), S160--S167.
- Huh, Y., Jung, J. W., Park, C., Ryu, J. R., Shin, C. Y., Kim, W.-K., y Ryu, J. H. (2003). Microglial activation and tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigral region following transient focal ischemia in rats. *Neuroscience Letters*, 349(1), 63–67. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(03\)00743-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(03)00743-2)
- Ill-Raga, G., Ramos-Fernández, E., Guix, F. X., Tajés, M., Bosch-Morató, M., Palomer, E., ... others. (2010). Amyloid- β peptide fibrils induce nitro-oxidative stress in neuronal cells. *Journal of Alzheimer's Disease*, 22(2), 641–652. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100474>
- Invernizzi, F., Panteghini, C., Chiapparini, L., Moroni, I., Nardocci, N., Garavaglia, B., y Tonduti, D. (2017). Thiamine-responsive disease due to mutation of tpk1: Importance of avoiding misdiagnosis. *Neurology*, 89(8), 870–871.
- Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., y Kohsaka, S. (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Molecular Brain Research*, 57(1), 1–9.
- Jack Jr, C. R., Bennett, D. A., Blennow, K., Carrillo, M. C., Dunn, B., Haeberlein, S. B., ... others. (2018). NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 14(4), 535–562.
- Johnson, F., y Giulivi, C. (2005). Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(4), 340–352.
- Karuppagounder, S. S., Xu, H., Shi, Q., Chen, L. H., Pedrini, S., Pechman, D., ... Gibson, G. E. (2009). Thiamine deficiency induces oxidative stress and exacerbates the plaque pathology in Alzheimer's mouse model. *Neurobiology of Aging*, 30(10), 1587–1600.
- Kennedy, A. M., Frackowiak, R. S. J., Newman, S. K., Bloomfield, P. M., Seaward, J., Roques, P., ... Rossor, M. N. (1995). Deficits in cerebral glucose metabolism demonstrated by positron emission tomography in individuals at risk of familial Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 186(1), 17–20.
- Kitazawa, M., Yamasaki, T. R., y Laferla, F. M. (2004). Microglia as a Potential Bridge between the Amyloid β -Peptide and Tau. *Annals of the New York*

Academy of Sciences, 1035(1), 85–103.

Koh, F., Charlton, K., Walton, K., y McMahon, A.-T. (2015). Role of dietary protein and thiamine intakes on cognitive function in healthy older people: A systematic review. *Nutrients*, 7(4), 2415–2439.

Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences*, 19(8), 312–318.

Liu, H., Sang, S., Lu, Y., Wang, Z., Yu, X., y Zhong, C. (2017). Thiamine metabolism is critical for regulating correlated growth of dendrite arbors and neuronal somata. *Scientific Reports*, 7(1), 5342.

Liu, M., Jevtic, S., Markham-Coultes, K., Ellens, N. P. K., O'Reilly, M. A., Hynynen, K., ... McLaurin, J. (2018). Investigating the efficacy of a combination A β -targeted treatment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Research*, 1678, 138–145.

Longo, F. M., y Massa, S. M. (2004). Neuroprotective strategies in Alzheimer's disease. *NeuroRx*, 1(1), 117–127.

Lovell, M. A., Robertson, J. D., Teesdale, W. J., Campbell, J. L., y Markesbery, W. R. (1998). Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *Journal of the Neurological Sciences*, 158(1), 47–52.

Mangialasche, F., Solomon, A., Winblad, B., Mecocci, P., y Kivipelto, M. (2010). Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *The Lancet Neurology*, 9(7), 702–716.

Mancilla-Perez, J. (2017). *Efecto de un TP bifuncional sobre la memoria espacial y la agregación de β -amiloide en el ratón 3xTg-AD*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Manzetti, S., Zhang, J., y van der Spoel, D. (2014). Thiamin function, metabolism, uptake, and transport. *Biochemistry*, 53(5), 821–835.

Marcé-Grau, A., Martí-Sánchez, L., Baide-Mairena, H., Ortigoza-Escobar, J. D., & Pérez-Dueñas, B. (2019). Genetic defects of thiamine transport and metabolism: A review of clinical phenotypes, genetics, and functional studies. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 42(4), 581–597.

Mastrogiacomo, F., Lindsay, J. G., Bettendorff, L., Rice, J., y Kish, S. J. (1996). Brain

- protein and α -ketoglutarate dehydrogenase complex activity in alzheimer-s disease. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 39(5), 592–598.
- Mielgo-Ayuso, J., Aparicio-Ugarriza, R., Olza, J., Aranceta-Bartrina, J., Gil, Á., Ortega, R., ... González-Gross, M. (2018). Dietary Intake and Food Sources of Niacin, Riboflavin, Thiamin and Vitamin B6 in a Representative Sample of the Spanish Population. The ANIBES Study. *Nutrients*, 10(7), 846.
- Mohamed, A., Cortez, L., y de Chaves, E. (2011). Aggregation state and neurotoxic properties of alzheimer β -amyloid peptide. *Current Protein and Peptide Science*, 12(3), 235–257.
- Mosconi, L., Pupi, A., y De Leon, M. J. (2008). Brain glucose hypometabolism and oxidative stress in preclinical Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147, 180.
- O'Brien, R. J., y Wong, P. C. (2011). Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annual Review of Neuroscience*, 34, 185–204.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P. P., Golde, T. E., Kaye, R., ... LaFerla, F. M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39(3), 409–421. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00434-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00434-3)
- Pepersack, T., Garbusinski, J., Robberecht, J., Beyer, I., Willems, D., y Fuss, M. (1999). Clinical relevance of thiamine status amongst hospitalized elderly patients. *Gerontology*, 45(2), 96–101.
- Prince, M., Albanese, E., Guerchet, M., y Prina, M. (2014). World Alzheimer Report 2014: Dementia and risk reduction: An analysis of protective and modifiable risk factors. London: Alzheimer Disease International.
- Prince, M. J. (2015). *World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia: an Analysis of Prevalence, Incidence, Cost and Trends*.
- Reidling, J. C., y Said, H. M. (2005). Adaptive regulation of intestinal thiamin uptake: molecular mechanism using wild-type and transgenic mice carrying hTHTR-1 and-2 promoters. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 288(6), G1127--G1134.

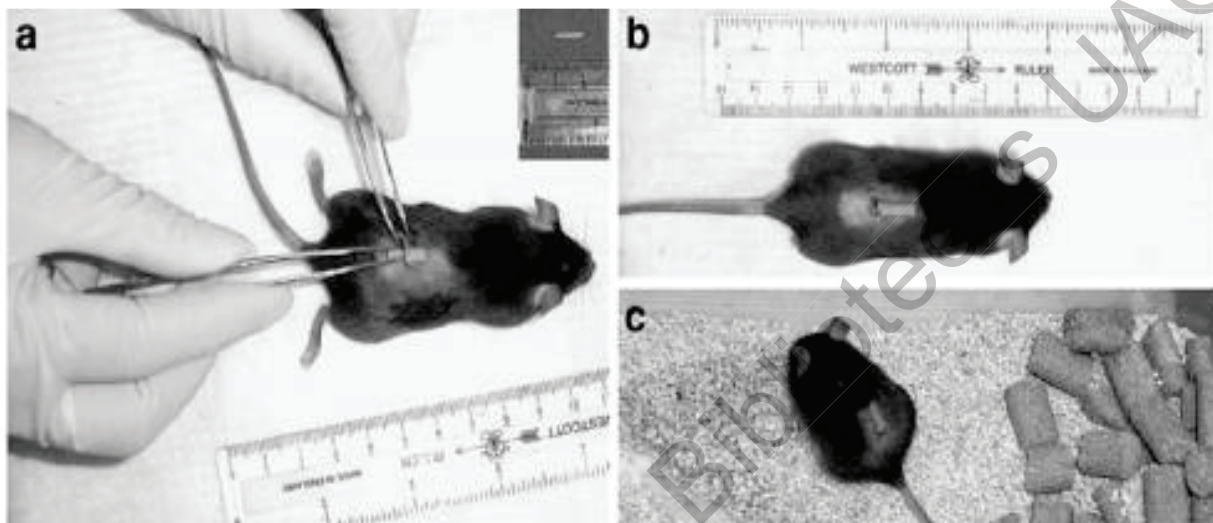
- Rodriguez, J. J., Noristani, H. N., Hilditch, T., Olabarria, M., Yeh, C. Y., Witton, J., y Verkhatsky, A. (2013). Increased densities of resting and activated microglia in the dentate gyrus follow senile plaque formation in the CA1 subfield of the hippocampus in the triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 552, 129–134.
- Rodriguez, J. J., Witton, J., Olabarria, M., Noristani, H. N., y Verkhatsky, A. (2010). Increase in the density of resting microglia precedes neuritic plaque formation and microglial activation in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Cell Death & Disease*, 1(1), e1.
- Said, H. M., Balamurugan, K., Subramanian, V. S., y Marchant, J. S. (2004). Expression and functional contribution of hTHTR-2 in thiamin absorption in human intestine. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 286(3), G491--G498.
- Schwartz, M., Butovsky, O., Brück, W., y Hanisch, U.-K. (2006). Microglial phenotype: is the commitment reversible? *Trends in Neurosciences*, 29(2), 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.12.005>
- Squitti, R. (2014). Copper subtype of Alzheimer's disease (AD): Meta-analyses, genetic studies and predictive value of non-ceruloplasmim copper in mild cognitive impairment conversion to full AD. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 28(4), 482–485.
- Streit, W. J. (2002). *Microglia as Neuroprotective , Immunocompetent Cells of the CNS*. 139(February), 133–139. <https://doi.org/10.1002/glia.10154>
- Swomley, A. M., Förster, S., Keeney, J. T., Triplett, J., Zhang, Z., Sultana, R., y Butterfield, D. A. (2014). Abeta, oxidative stress in Alzheimer disease: evidence based on proteomics studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1842(8), 1248–1257. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.09.015>.Abeta
- Thinakaran, G., y Koo, E. H. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 283). ASBMB.
- Tougu, V., Karafin, A., y Palumaa, P. (2008). Binding of zinc (II) and copper (II) to the full-length Alzheimer's amyloid- β peptide. *Journal of Neurochemistry*,

104(5), 1249–1259.

- Tramutola, A., Lanzillotta, C., Perluigi, M., y Butterfield, D. A. (2016). Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. *Brain Research Bulletin*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.06.005>
- Turck, D., Bresson, J.-L., Burlingame, B., Dean, T., Fairweather-Tait, S., Heinonen, M., ... others. (2016). Dietary reference values for thiamin. *EFSA Journal*, 14(12).
- Vajda, F. J. E. (2004). Neuroprotection and neurodegenerative disease. In *Alzheimer's Disease* (pp. 235–243). Springer.
- Venegas, C., y Heneka, M. T. (2017). Danger-associated molecular patterns in Alzheimer's disease. *Journal of Leukocyte Biology*, 101(1), 87–98.
- Vorhees, C. V, y Williams, M. T. (2006). Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature Protocols*, 1(2), 848–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.116>
- Wang, C., Fei, G., Pan, X., Sang, S., Wang, L., Zhong, C., y Jin, L. (2018). High thiamine diphosphate level as a protective factor for Alzheimer's disease. *Neurological Research*, 40(8), 658–665.
- Zatta, P., Drago, D., Bolognin, S., y Sensi, S. L. (2009). Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(7), 346–355.
- Zhao, R., Gao, F., y Goldman, I. D. (2001). Molecular cloning of human thiamin pyrophosphokinase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1517(2), 320–322.
- Zilka, N., Ferencik, M., y Hulin, I. (2005). Neuroinflammation in Alzheimer's disease: protector or promoter? *Bratislavske Lekarske Listy*, 107(9–10), 374–383.

XI. APÉNDICES

XI.1 Imagen representativa de la cirugía para la implantación de bombas osmóticas.



Incisión de 1-1.5 cm, se implanta la bomba de forma subcutánea a un nivel del plano medio dorsal y finalmente se sutura la herida.

XI.2 Fotografías representativas de la puntuación para la conducta de construcción del nido basada en el protocolo de Deacon.



1. Algodón completamente intacto (porcentaje <90%)

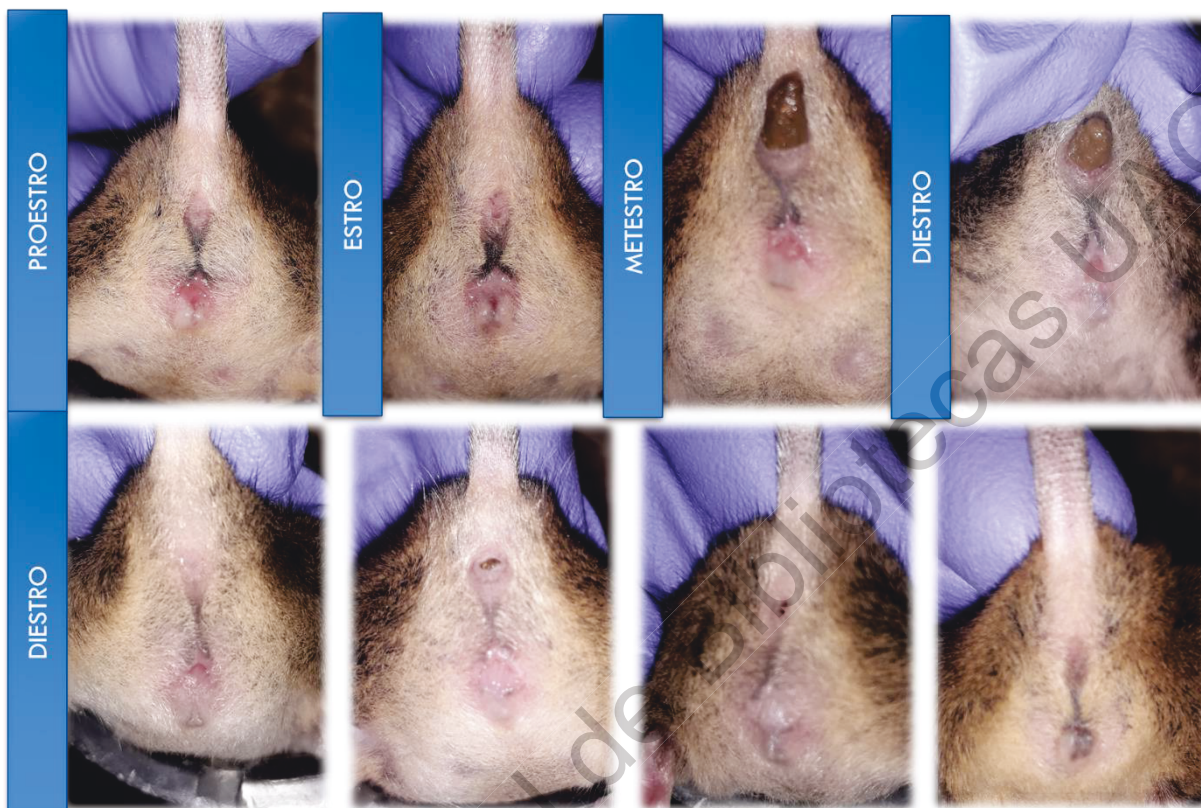
2. Algodón parcialmente desgarrado (porcentaje 50-90% intacto)

3. Algodón mayormente triturado sin sitio de nido (porcentaje <90%)

4. Nido identificable pero plano dentro de un cuarto de la caja (porcentaje <90%)

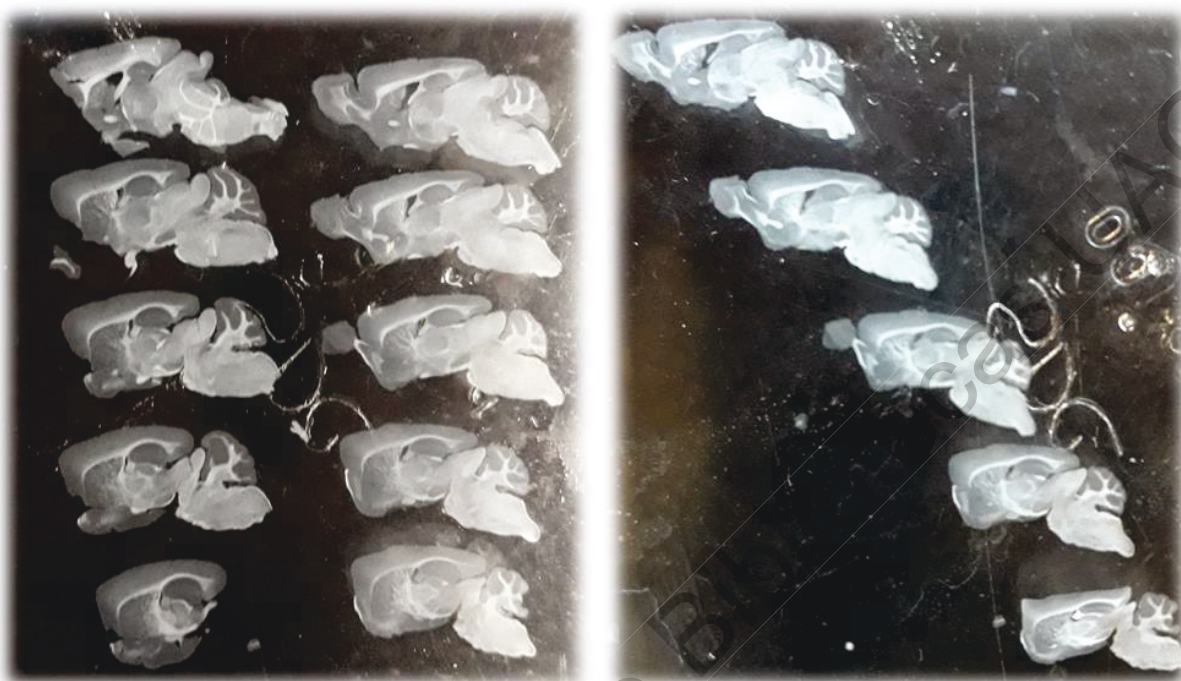
5. Nido consolidado que forma un cráter que cubre el cuerpo completo

XI.3 Fotografías representativas de la determinación del ciclo estral.



Para la determinación del ciclo estral se consideró que la apertura vaginal de ratones en el proestro fuera amplia con el tejido rosado, hinchado y húmedo. A medida que el ratón ingresa al estro, la abertura vaginal se vuelve menos húmeda, menos rosada y menos hinchada. Durante el metestro hay una abertura muy poco pronunciada, no inflamada y en el diestro la abertura vaginal es pequeña y cerrada sin inflamación del tejido.

XI.4 Fotografías representativas de la selección de cortes para histología.



Selección de cortes histológicos con base en el atlas de Paxinos, se seleccionaron de 4 a 5 cortes de 40um, utilizando series de 320 um en las que se abarca el hipocampo dorsal.

Dirección General de