

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Químicas

Instituto de Ciencias-UAP

Posgrado en Ciencias Químicas

Área de Bioquímica y Biología Molecular

Laboratorio de Neurofarmacología



TESIS DOCTORAL

Estudio de la neuroinflamación inducida por la administración del péptido A β ₂₅₋₃₅ en la región CA1 del hipocampo: Sobre la expresión de galectinas y su relación con los cambios en el proceso de neurogénesis y la memoria

Que para obtener el grado de:

**Doctor en Ciencias Químicas en el
área de Bioquímica y Biología Molecular**

Presenta

M.C. Eleazar Ramírez Hernández

Director de tesis

Dr. I. Daniel Limón Pérez de León

**Facultad de Ciencias Químicas - Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
Laboratorio de Neurofarmacología**

18 de Junio del 2018



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por la Dra. Lourdes Millán Pérez Peña, Dra. Adriana Berenice Silva Gómez, Dr. Miguel Ángel Mayoral Chávez, Dra. Isabel Martínez García y la Dra. María del Carmen Vivar Estudillo, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **“Estudio de la Neuroinflamación inducida por la administración del péptido A β 25-35 en la región CA1 del hipocampo sobre la expresión de galectinas y su relación con los cambios en la neurogénesis y la memoria”**, que presenta el alumno **M.C. Eleazar Ramírez Hernández** para obtener el grado de Doctorado en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los ocho días del mes de mayo del año dos mil dieciocho.

ATENTAMENTE

Dra. Lourdes Millán Pérez Peña

Dra. Adriana Berenice Silva Gómez

Dr. Miguel Ángel Mayoral Chávez

Dra. Isabel Martínez García

Dra. María del Carmen Vivar Estudillo

A mi madre y abuelos

Leyenda Maya

Los mayas más viejos y sabios cuentan que los Dioses crearon todas las cosas en la Tierra y al hacerlo, a cada animal, a cada árbol y a cada piedra le encargaron un trabajo. Pero cuando ya habían terminado, notaron que no había nadie encargado de llevar sus deseos y pensamientos de un lugar a otro.

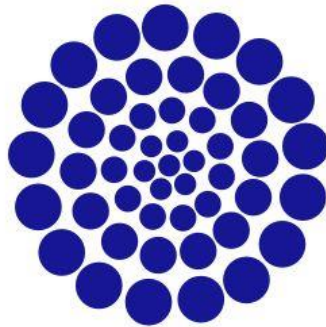


Como ya no tenían barro ni maíz para hacer otro animal, tomaron una piedra de jade y con ella tallaron una flecha muy pequeña. Cuando estuvo lista, soplaron sobre ella y la pequeña flecha salió volando. Ya no era más una simple flecha, ahora tenía vida, los dioses habían creado al

x ts'unu'um (colibrí).

“El x ts'unu'um lleva de aquí para allá los pensamientos de los hombres”

Agradecimientos



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

El sustentante del presente trabajo contó con el apoyo de la beca-tesis **No. 418135**, otorgada por el consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) durante el periodo 2014-2017.

El presente trabajo fue apoyado por el proyecto CONACYT **CB2011-169023** otorgado al Dr. I. Daniel Limón Pérez de León.

Agradecimientos



El presente trabajo fue apoyado parcialmente por la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.



El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Neurofarmacología - Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

A la comisión revisora del presente trabajo

El apoyo que me han otorgado en la revisión de esta tesis resulta en un gran aprendizaje que es invaluable. Agradezco el tiempo, la dedicación, los comentarios y aportaciones que han mejorado enormemente el trabajo.

Externo mi profunda admiración y gratitud.

A:

Dra. Lourdes Millán Pérez Peña

Dra. Adriana Berenice Silva Gómez

Dra. Isabel Martínez García

Dra. María del Carmen Vivar Estudillo

Dr. Miguel Ángel Mayoral Chávez

Agradecimiento

A mi director de tesis

Al Dr. Daniel Limón Pérez de León

Por haberme aceptado en su grupo de trabajo ya hace más de 10 años, por la confianza depositada en cada proyecto realizado para mi desarrollo científico y por haberme dado su confianza para realizarlo.

También por todos los momentos gratos que se han vivido en laboratorio.

¡Muchas gracias!

A todos los profesores que forman parte de la planta docente del posgrado en Ciencias Químicas en el área de Bioquímica y Biología Molecular y colaboradores.

Agradecimientos

Gracias a la vida que me ha dado tanto, me ha dado a la persona que mas admiro y quiero, a mi madre Angelina Hernández Enriquez, quien siempre ha estado en todos los momentos buenos y malos para apoyarme y siempre aconsejarme en el camino de la vida. Agradezco sus enseñanzas y su confianza que me inspiran a no darme por vencido y a seguir luchando para alcanzar todos los objetivos propuestos.

Agradezco a toda mi familia, quienes siempre han estado ahí para apoyarme, a mis abuelos quienes siempre me han enseñado a el valor del trabajo.

Agradezco al Dr. Daniel Limón, ya que he aprendido mucho de lo que significa tener una vida científica. Tambien agradezco por todo el apoyo recibido y sobre todo por las enseñanzas del quehacer científico y a ser un hombre de ciencia.

Agradezco a Claudia Febe Sánchez Maldonado quien me ha enseñado mucho y con quien he formado un buen equipo de trabajo. Agrazco las aportaciones realizadas a la presente tesis y a los trabajos en los cuales ha colaborado y que a pesar de las diferencias que pudiésemos haber tenido siempre ha aportado un punto de vista objetivo.

Agradezco a todos y cada uno de los compañeros del laboratorio de Neurofarmacología, que con el trabajo conjunto de todos ha crecido en el ámbito científico, académico y social. Agradezco a la Dra. Aleidy Patricio, Dra. Victoria Palafox, Olivia, Claudia, Griselda, Grego D., Felipe, Liliana, Patricia, Diana, Cristina, Lesli, Janeth, Berenice, Guadalupe, Viviana e Irving. Muchas gracias por todas sus aportaciones y sobre todo por todo su apoyo con sus comentarios, observaciones y sobre todo en la parte técnica ya que sin su ayuda seria difícil realizar esta tesis.

¡Muchas Gracias!

Índice

Resumen	I
Abstract.....	III
1. Introducción	1
1.1 Estructura y función de la formación hipocampal	1
1.2 Participación de la formación hipocampal en el proceso de aprendizaje y memoria.....	3
1.3 Mecanismos moleculares en la plasticidad sináptica	6
1.4 Neurogénesis: un sustrato necesario en la formación de la memoria	10
1.5 La enfermedad de Alzheimer	17
1.6 La inflamación como un mecanismo de toxicidad del amiloide- β	19
1.7 El péptido amiloide- β_{25-35} como un modelo para estudiar la enfermedad de Alzheimer.....	22
1.8 El péptido A β y la neuroinflamación como un factor clave en la neurodegeneración	25
1.9 Galectinas: moduladores del proceso de inflamación	28
2. Justificación	35
3. Hipótesis	37
4. Objetivo general	37
4.1 Objetivos particulares.....	37
5. Diagrama de trabajo.....	38
6. Materiales y métodos	39
6.1 Animales de experimentación	39
6.2 Preparación del péptido A β_{25-35}	39
6.3 Administración del péptido A β_{25-35} en la región CA1 del hipocampo por cirugía estereotáxica.....	40
6.4 Administración de BrdU	41
6.5 Evaluación del aprendizaje y memoria en el laberinto acuático de Morris...	41
6.6 Evaluación de las dendritas y las espinas dendríticas por la tinción de Golgi-Cox	43
6.7 Análisis microscópico y método de Sholl	44
6.8 Preparación de los tejidos cerebrales para la técnica de inmunofluorescencia	46
6.9 Evaluación de la expresión de NeuN por inmunofluorescencia	47

6.10 Evaluación de la marca de BrdU y la expresión de DCX por inmunohistoquímica	48
6.11 Evaluación de astrocitos, microglia y galectinas por inmunohistoquímica de fluorescencia	49
6.12 Determinación de citocinas por el método de ELISA en sandwich	51
6.13 Obtención de extractos citoplásmicos	53
6.14 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	53
6.15 Desnaturalización de proteínas.....	54
6.16 Detección de proteínas por Western Blot.....	54
6.17 Analisis estadístico	55
7. Resultados	56
7.1 La administración del péptido $A\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo genera daño sobre la memoria espacial	56
7.2 El daño en la evocación de la memoria está asociado a los cambios morfológicos inducidos por el péptido $A\beta_{25-35}$ en el giro dentado	58
7.3 La administración del péptido $A\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo disminuye la densidad de espinas dendríticas en el giro dentado.....	62
7.4 La administración del péptido $A\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo genera daño sobre la memoria a largo plazo	64
7.5 El péptido $A\beta_{25-35}$ disminuye el número de células positivas a NeuN	67
7.6 El péptido $A\beta_{25-35}$ genera un daño sobre el proceso de neurogénesis	69
7.7 El péptido $A\beta_{25-35}$ induce neuroinflamación en el hipocampo dorsal.....	71
7.8 La administración del péptido $A\beta_{25-35}$ induce la expresión de Galectina-3 ...	74
7.9 El $A\beta_{25-35}$ induce la activación de astrocitos y la expresión de Galectina-3..	75
7.10 El péptido $A\beta_{25-35}$ induce la activación de microglia y la expresión de galectinas	79
8. Discusión	83
9. Esquema hipotético.....	96
10. Conclusión	97
11. Perspectivas	97
12. Bibliografía	98

Índice de figuras

Figura 1. Localización de la formación hipocampal.	1
Figura 2. Morfología de las neuronas de la región CA1 del hipocampo y del giro dentado.	3
Figura 3. Estructura y anatomía del circuito neuronal del hipocampo.	6
Figura 4. Mecanismos moleculares del aprendizaje y la memoria, y la potenciación a largo plazo	9
Figura 5. Neurogénesis en la etapa adulta en la región del giro dentado de la formación del hipocampo.	14
Figura 6. Marcadores histopatológicos en la EA.	18
Figura 7. Metabolismo de la PPA	20
Figura 8. Mecanismos moleculares de toxicidad del péptido A β	21
Figura 9. El A β modula la expresión y funcionalidad de los receptores AMPA y NMDA.	23
Figura 10. El péptido A β promueve la actividad de astrocitos y microglia.	27
Figura 11. Estructura del CRD de galectina-1.	31
Figura 12. Estructura y clasificación de galectinas e interacciones galectina-glicano.	32
Figura 13. Coordenadas de la región CA1 del hipocampo.	40
Figura 14. Laberinto acuático de Morris.	43
Figura 15. Análisis de Sholl para la evaluación de una neurona.	46
Figura 16. Curva de calibración para determinar la concentración de citocinas... ..	52
Figura 17. La administración del péptido A β ₂₅₋₃₅ en la región CA1 del hipocampo induce un daño en la memoria espacial.	57
Figura 18. La administración del péptido A β ₂₅₋₃₅ en la región CA1 del hipocampo induce un cambio en la morfología de neuronas granulares de giro dentado.	58
Figura 19. La administración del péptido A β ₂₅₋₃₅ en la región CA1 del hipocampo disminuyó la longitud dendrítica de las células del GD.	61
Figura 20. La administración del péptido A β ₂₅₋₃₅ disminuye el número de espinas dendrítica en la región de GD.	63
Figura 21. La administración del péptido A β ₂₅₋₃₅ en la región CA1 del hipocampo no genera daño en el aprendizaje.	65
Figura 22. La administración del péptido A β ₂₅₋₃₅ en la región CA1 del hipocampo genera daño en la memoria a largo plazo.	66
Figura 23. El péptido A β ₂₅₋₃₅ disminuye la inmunorreactividad a NeuN en la CA1 del hipocampo y en el GD.	68
Figura 24. La administración del péptido A β ₂₅₋₃₅ en la región CA1 del hipocampo decrece la neurogénesis en la región del GD.	70
Figura 25. La administración del péptido A β ₂₅₋₃₅ en la región CA1 del hipocampo induce un incremento en la inmunorreactividad de astrocitos y microglia.	71
Figura 26. La administración del péptido A β ₂₅₋₃₅ en la región CA1 del hipocampo induce un proceso de neuroinflamación.	73
Figura 27. La administración del péptido A β ₂₅₋₃₅ en la región CA1 del hipocampo incrementa la expresión de Gal-3 en la formación hipocampal.	74

Figura 28. El péptido A β ₂₅₋₃₅ disminuye la expresión de Gal-1 que está asociado con la activación de astrocitos en CA1 y GD.....	76
Figura 29. El péptido A β ₂₅₋₃₅ incrementa la expresión de Gal-3 asociada a la activación de astrocitos en CA1 y GD.	78
Figura 30. El péptido A β ₂₅₋₃₅ no modifica la expresión de Gal-1 en células de la microglía asociado a la neuroinflamación en CA1 y DG.	80
Figura 31. El péptido A β ₂₅₋₃₅ incrementa la expresión de Gal-3 en células de la microglía en CA1 y DG.....	82
Figura 32. La administración del péptido A β ₂₅₋₃₅ induce un proceso de neuroinflamación que genera un daño neuronal.	96

Abreviaciones

3-NT	3-nitrotirosina
Aβ	amiloide beta
AC	adenilato ciclasa
AMPA	alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
ATP	adenosín trifosfato
BDNF	factor neurotrófico derivado del cerebro
BrdU	5-bromo-2-deoxiuridina
CE	corteza entorrinal
CPN	células progenitoras neuronales
CRD	dominios de reconocimiento a carbohidratos
CREB	proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DCX	doblecortina
EA	enfermedad de Alzheimer
FITC	fluoresceína 5-isotiocianato
Gal	galactosa
Gal-1	Galectina-1
Gal-3	Galectina-3
GalNAc	N-acetilgalactosamina
GD	giro dentado
GFAP	proteína ácida glial fibrilar
IL-1R	receptor a IL-1
iNOS	sintasa de óxido nítrico inducible
Jak/STAT	Janus-cinasas-transductores de la señal y activadores de la transcripción
LAM	laberinto acuático de Morris

LTD	depresión a largo plazo
LTP	potenciación a largo plazo
MHC II	complejo mayor de histocompatibilidad clase II
MNF	marañas neurofibrilares
NeuN	proteína neuronal específica
NF-κB	factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDAR	receptores N-metil-D-aspartato
NO	óxido nítrico
p38MAPK	proteína quinasa activada por mitógeno p38
PKA	proteína cinasa A
PNs	placas neuríticas
PPA	proteína precursora del amiloide
PRR	receptores de reconocimiento de patrones
PSA-NCAM	moléculas de adhesión celular neuronal polisialilada
PSD	densidad postsináptica
RNS	especies reactivas de nitrógeno
ROS	especies reactivas de oxígeno
SNC	sistema nervioso central
TLR	receptores tipo Toll
VL	ventrículos laterales
ZSG	zona subgranular
ZSV	zona subventricular

Resumen

El estudio del daño inducido por el péptido Amiloide- β 25-35 ($A\beta_{25-35}$) en la formación de la memoria en modelos animales ha permitido comprender las causas del deterioro cognitivo similar al que se presenta en la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, es incierto si el deterioro cognitivo se debe a una interrupción en la codificación y consolidación de la información, o un deterioro en la capacidad de evocación de la memoria. Evidencias recientes han demostrado que la administración de $A\beta_{25-35}$ en el hipocampo dorsal de ratas induce una respuesta de inflamación que conlleva a la neurodegeneración y en consecuencia un deterioro en la memoria. Se ha propuesto a Galectina-1 (Gal-1) y Galectina-3 (Gal-3) como moduladores de la respuesta de neuroinflamación, la proliferación celular, la adhesión y migración celular, y la apoptosis. Por lo que proponemos que las galectinas pudieran participar en la modulación de la neuroinflamación inducida por $A\beta_{25-35}$. El objetivo de este estudio fue evaluar la expresión de Gal-1 y Gal-3 en la neuroinflamación inducida por la administración del péptido $A\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo, asociados a cambios morfológicos y en la neurogénesis con el déficit en la memoria espacial. Ante la administración de $A\beta_{25-35}$, se realizó la evaluación del aprendizaje y la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris. En la prueba conductual se mostró que el péptido $A\beta_{25-35}$ no afectaba el aprendizaje espacial, pero sí alteraba la memoria, lo que está correlacionado con un incremento en el tiempo en encontrar la plataforma de escape. Al día 32 posterior a la prueba conductual se evaluaron los cambios morfológicos en giro dentado (GD) mediante el empleo de la tinción de Golgi-Cox. Se evaluó la inmunorreactividad a 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) que permite el marcaje de las células en proliferación, la proteína neuronal nuclear específica (NeuN) y doblecortina (DCX). El presente trabajo demostró un deterioro en la evocación de la memoria al día 17 y 31 ante la administración del péptido $A\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo. Al día 32 se demostraron cambios morfológicos en las células granulares del GD, evidenciados por una disminución en la longitud dendrítica y en el número de espinas dendríticas. En la neurogénesis, se encontró que el número total de células positivas a BrdU y DCX en la capa de células granulares del hipocampo disminuyó en los animales

tratados con $A\beta_{25-35}$. Para evidenciar la neuroinflamación se evaluó el número de astrocitos (GFAP) y microglia (Iba1) en hipocampo, así como la expresión de Gal-1 y Gal-3 mediante análisis inmunohistoquímico, y las citocinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α , IFN- γ por el método de ELISA. Los resultados de este estudio mostraron un aumento significativo en la expresión de Gal-3 en la microglia y los astrocitos en el hipocampo dorsal. La expresión de Gal-3 se asocia con el incremento de las citocinas proinflamatorias en la formación del hipocampo de ratas administradas con el péptido $A\beta_{25-35}$. Los resultados de este estudio sugieren que la administración del péptido $A\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo induce un deterioro de la recuperación de la memoria, que se asocia con alteraciones en la neurogénesis y cambios morfológicos en el GD. La expresión de Gal-3 participa en la inflamación inducida por la administración de $A\beta_{25-35}$ y podría estar implicada en el progreso de la neurodegeneración y en el deterioro de la memoria.

Abstract

Memory impairment by the Amyloid- β 25-35 ($A\beta_{25-35}$) peptide in animal models has provided an understanding of the causes behind the similar deterioration that occurs in Alzheimer's disease. However, it is uncertain as to whether the cognitive impairment is due to disrupted encoding and consolidation of the information, or an impairment in the retrieval of stored memory information. Recent evidences have shown that the administration of $A\beta_{25-35}$ into the hippocampus of rats increases the inflammatory response that causes memory impairment and neurodegeneration. Galectins are animal lectins that bind to β -galactosides contained in glycoproteins or glycolipids, such as lactose and N-acetyllactosamine. Galectin-1 (Gal-1) and Galectin-3 (Gal-3) are involved in pathologies associated with the inflammatory process, cell proliferation, cell adhesion and migration, and apoptosis. Galectins could participate in the modulation of the neuroinflammation induced by the $A\beta_{25-35}$. The aim of this study was to evaluate the expression of Gal-1 and Gal-3 during the neuroinflammation induced by the administration of the $A\beta_{25-35}$ peptide into the hippocampus, morphological changes and neurogenesis associated with deficit in the spatial memory. After the administration of $A\beta_{25-35}$, animals were tested for spatial learning and memory in the Morris water maze. Behavioral performance showed that $A\beta_{25-35}$ didn't affect spatial learning but did impair memory, with animals taking longer to find the platform. On day 32 morphological changes were evaluated the in the DG using Golgi-Cox stain. The immunoreactivity to 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) was evaluated to enable the labeling of cells corresponding to cellular proliferation period post damage, neuronal specific nuclear protein (NeuN) and doublecortin (DCX). This study found memory retrieval impairment occurring at day 17, a cognitive deficit which had increased significantly at day 31 after the administration of $A\beta_{25-35}$ peptide in the CA1 of the hippocampus. Morphological changes were found in the granular cells of the DG, such as a shorter dendritic length and a decrease in the number of dendritic spines. In neurogenesis, the total number of cells positive to BrdU and DCX in the granule cell layer of DG declined in animals treated with $A\beta_{25-35}$. The hippocampus was examined for astrocytes (GFAP), microglia (Iba1), Gal-1 and Gal-3 via immunohistochemical analysis, and the

cytokines IL-1 β , TNF- α , IFN- γ by ELISA. This study's results showed a significant increase in the expression of Gal-3 in the microglia and astrocytes, while Gal-1 increased only in microglia of dorsal hippocampus. The expression of galectins is associated with the increased cytokines in the hippocampal formation of A β ₂₅₋₃₅ treated rats. The results of this study suggest that the administration of the A β ₂₅₋₃₅ peptide in the CA1 of the rat hippocampus induces memory retrieval impairment, that is associated with both alterations in neurogenesis and morphological changes in the dentate gyrus. The expression of Gal-3 participates in the inflammation induced by administration of A β ₂₅₋₃₅ and could be involved in the neurodegeneration progress and memory impairment.

1. Introducción

1.1 Estructura y función de la formación hipocampal

La formación hipocampal integra la información sensorial proveniente de diferentes áreas corticales. Permite el almacenamiento temporal de la información hasta que se desarrolla una representación neocortical implicada en la formación de la memoria a largo plazo (Insausti y Amaral, 2004), atributo único que es determinado por la organización estructural y anatómica de la formación hipocampal (Witter y Amaral, 2004). Desde el punto de vista anatómico-estructural, la formación hipocampal es un conjunto de estructuras subcorticales anatómicamente distintas, localizadas bajo la neocorteza (Andersen y cols., 1996a, 1996b; O'Mara y cols., 2001; Squire, 2004; van Strien y cols., 2009) (Figura 1).

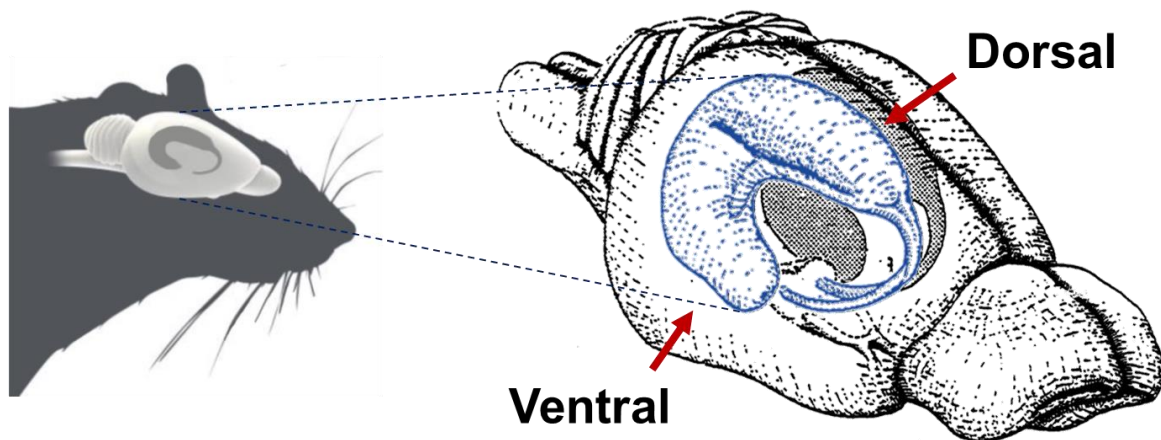


Figura 1. Localización de la formación hipocampal. En color azul se muestra la localización de la formación hipocampal (Tomado y modificado de Amaral y Lavenex, 2007).

En la formación del hipocampo se presentan dos clases principales de neuronas: las neuronas principales (de proyección) que representan la mayoría de las neuronas, y las células axónicas cortas (interneuronas). Las neuronas principales son de naturaleza glutamatérgica (excitadoras) y poseen dendritas espinosas. Las interneuronas son de naturaleza GABAérgica (inhibidoras), presentan características morfológicas y neuroquímicas variadas y se distribuyen prácticamente en todas las regiones y capas de la formación del hipocampo (Amaral y Lavenex, 2007; Bezaire y Soltesz, 2013). El término hipocampo se usa

comúnmente en un sentido amplio, para incluir al hipocampo y el giro dentado (GD). El hipocampo y el GD son cruciales para la formación de la memoria ya que contribuyen activamente en la integración de la información (Insausti y Amaral, 2004).

El hipocampo es una región de la formación hipocampal, compuesta por campos denominados CA (abreviación de *Cuerno de Ammón* o *Cournu Ammonis*, que hace referencia a los cuernos de carnero del dios egipcio Ammón). La organización laminar en general es similar en todas las áreas del hipocampo, la capa celular principal es llamada capa de células piramidales. Lorente de Nó, dividió al hipocampo en tres regiones: la región superior la llamó CA1 y la inferior la dividió en dos regiones CA2 y CA3 (Figura 2A) (Witter y Amaral, 2004; Amaral y Lavenex, 2007). En el hipocampo dorsal, el 90% de las células son células piramidales de fenotipo glutamatérgico (Figura 2B) y el 10% restante son interneuronas de fenotipo GABAérgico. Cabe señalar que las aferencias que recibe el hipocampo son terminales axónicas de neuronas noradrenérgicas del *locus coeruleus*, serotoninérgicas del núcleo de rafe dorsal y colinérgicas provenientes del núcleo septal (Witter y Amaral, 2004; Amaral y Lavenex, 2007).

El GD tiene un espesor aproximado de 250 μm , se encuentra por debajo de la capa molecular y se compone de una capa densa de cuatro a ocho células granulares de espesor. El principal tipo de células del GD son las células granulares de fenotipo glutamatérgico. Las células granulares tienen un cuerpo celular elíptico con un diámetro aproximado de 10 μm y altura de 18 μm . Las células granulares y capas moleculares forman una estructura en forma de V- o U- (dependiendo de la posición septotemporal) que encierra una región celular, que constituye la tercera capa del giro dentado (Figura 2C). Las células granulares del giro dentado se encuentran organizadas de forma estrecha y tienen un árbol dendrítico característico en forma de cono, dirigidas hacia la porción superficial de la capa molecular. Se han identificado interneuronas “célula canasta” de fenotipo GABAérgico en GD, localizadas a lo largo y profundo de la capa de células granulares (Witter y Amaral, 2004; Frotscher y Seress, 2007; Spruston y McBain,

2007).

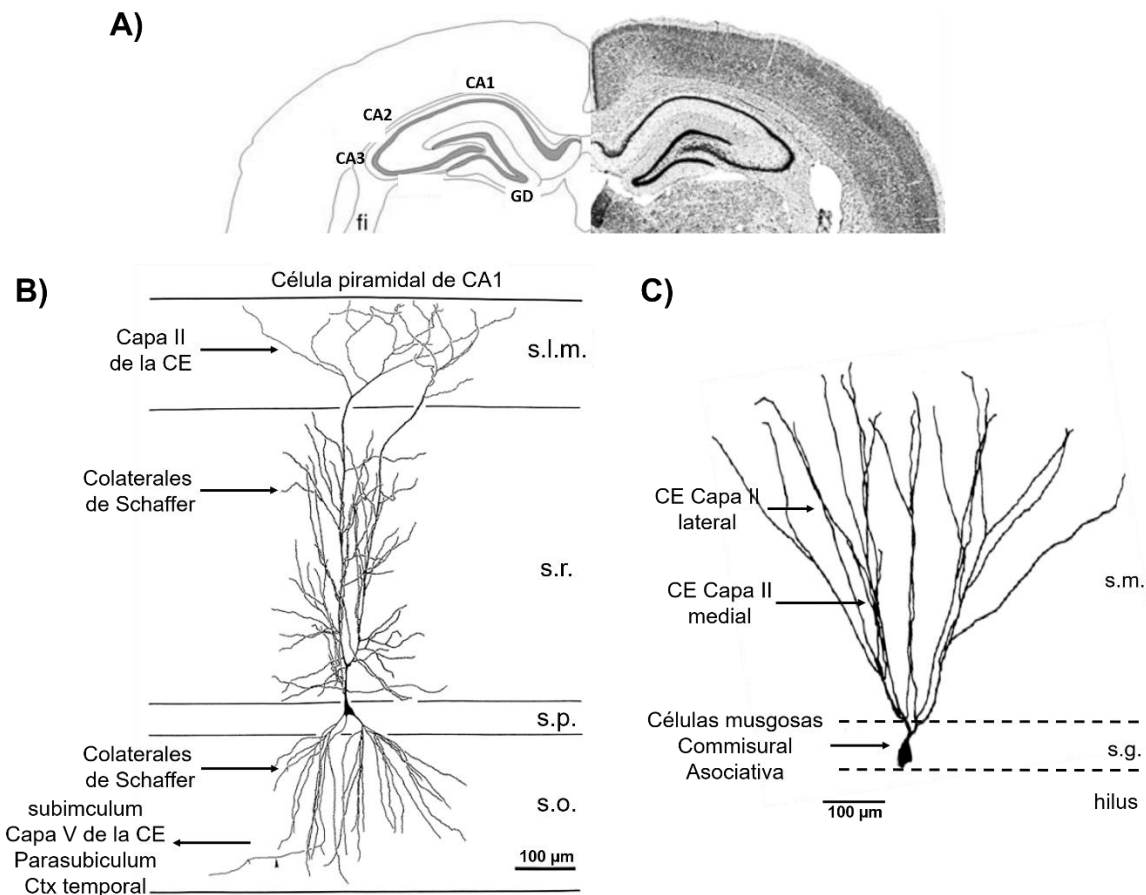


Figura 2. Morfología de las neuronas de la región CA1 del hipocampo y del giro dentado. En A) se muestra la localización y división de la formación del hipocampo. En B) se muestra el dibujo de una neurona piramidal de la región CA1 del hipocampo realizado con ayuda de una cámara lucida. Las dendritas que se extienden a través del *stratum radiatum*, se conocen como dendritas apicales y las dendritas que se extienden a través del *stratum oriens*, se conocen como dendritas basales o basales. s.l.m.: *stratum lucidum moleculare*; s.r.: *stratum radiatum*; s.p.: *stratum piramidale*; s.o.: *stratum oriens*. En C) se muestra el dibujo de una neurona granular del GD realizado con ayuda de una cámara lucida. Las dendritas se extienden del *stratum granulosum* (s.g.) hacia el *stratum moleculare* (s.m.). Escala barra = 100 µm (Tomado y modificado de Amaral y Lavenex, 2007).

1.2 Participación de la formación hipocampal en el proceso de aprendizaje y memoria

El aprendizaje es una manifestación de sobrevivencia que expresan los individuos como respuesta a los estímulos continuos generados por el medio que los rodea. La memoria por otra parte constituye la retención, almacenamiento y recuperación de la información previamente adquirida. El aprendizaje y la memoria son procesos correlacionados, capaces de sufrir modificaciones en función de los

estímulos ambientales. Desde el punto de vista procedimental, no se consigue separar el aprendizaje de la memoria, ni resulta posible realizar dicha distribución dentro del circuito neuronal (Morgado, 2005).

El hipocampo ha resultado ideal para estudiar e identificar a los circuitos neuronales implicados en el aprendizaje y la formación de la memoria, debido a su disposición neuroanatómica, a sus características fisiológicas y a su reconocida capacidad plástica (Stuchlik, 2014; Ben-Yakov y cols., 2015; Carasatorre y cols., 2016). Desde hace más de 100 años, Santiago Ramón y Cajal propuso originalmente que el fortalecimiento de las conexiones sinápticas en las neuronas podría ser un mecanismo de almacenamiento de la memoria, y que podría explicar la gran cantidad de información que se almacena (van Strien y cols., 2009; Tonegawa y cols., 2015a). Donald Hebb (1949) propuso a la sinapsis como uno de los ensambles neuronales adaptables que podrían codificar información en el cerebro, y de esa manera, adquiriría la capacidad de reproducir los patrones de actividad que surgen durante la experiencia (Arshavsky, 2006; Routtenberg, 2013; Tonegawa y cols., 2015b). El término plasticidad sináptica permite describir los cambios en las propiedades funcionales de una sinapsis como resultado de su actividad; que refiere a la posibilidad de inducir cambios que pueden o no ser reversibles (Routtenberg, 2013; Sweatt, 2016).

La sinapsis ha constituido uno de los mejores candidatos a sustrato mnemónico (McGaugh, 2000; Kandel, 2001), ya que es un tipo de unión celular sumamente especializada y constituye el sitio físico que sirve de puente principal para el paso de información de una neurona a otra, permitiendo que las diferentes partes del sistema interactúen funcionalmente (Dash y cols., 2004; Wang y cols., 2006; Ryan y cols., 2015; Sweatt, 2016). Se ha propuesto que la información puede almacenarse mediante cambios en la comunicación sináptica. Los cambios relacionados con el aprendizaje ocurren primero en el hipocampo, seguido del desarrollo gradual del trazo de la memoria que es distribuida en la neocorteza (Takeuchi y cols., 2013).

El aprendizaje es un proceso complejo y altamente dinámico, que conlleva a la formación de la memoria. Se define como aprendizaje a la adquisición de información para la formación de la memoria. La memoria se refiere a la capacidad de codificar, almacenar y recuperar información adquirida (Stulchlik, 2014; Guan y cols., 2015). La información adquirida es codificada mediante la actividad coordinada de un conjunto de neuronas y que se ha definido como “engramas” (Tonegawa y cols., 2015a, 2015b). El aprendizaje induce cambios duraderos en neuronas específicas que retienen la información y son reactivadas en condiciones apropiadas de evocación (Ryan y cols., 2015). Estas neuronas adquieren la capacidad de reproducir una y otra vez los patrones de actividad que se generaron durante la experiencia (Kandel, 2001; Dash y cols., 2004; Wang y cols., 2006). La formación de la memoria a largo plazo requiere de cuatro etapas: aprendizaje, consolidación, almacenamiento y evocación (McGaugh, 2000; Abel y Lattal, 2001; Dudai y cols., 2015).

La información adquirida durante el aprendizaje llega a la formación hipocampal a través de la corteza entorrinal (Figura 3). El procesamiento unidireccional de la información forma el “circuito trisináptico” (Andersen y cols., 1996 a, 1996b), que hace referencia al conjunto de conexiones conformado por la corteza entorrinal, el GD, la región CA3 y CA1 (Witter y Amaral, 2004; Amaral y Lavenex, 2007). Las células de la capa II de la corteza entorrinal (CE) proyectan axones hacia el GD, que forma la “vía perforante” (sinapsis 1). Las células granulares del GD reciben y envían la información mediante proyecciones axonales (fibras musgosas) que conectan con las células piramidales de la región CA3 del hipocampo (sinapsis 2). Las células piramidales de la región CA3 envían información hacia la región CA1 mediante las colaterales de Shaffer (sinapsis 3). La región CA1 del hipocampo proyecta unidireccionalmente al subículum. Una vez que alcanza la región CA1 al subículum, los patrones de conexiones intrínsecas comienzan a ser más complejos. La región CA1, por ejemplo, proyecta al subículum y también a la corteza entorrinal. Cada una de estas regiones tiene tipos celulares específicos que contribuyen al aprendizaje y a la formación de la memoria (Nakazawa y cols., 2002, 2004; Gold y Kesner, 2005; Kesner, 2007; 2013a; 2013b).

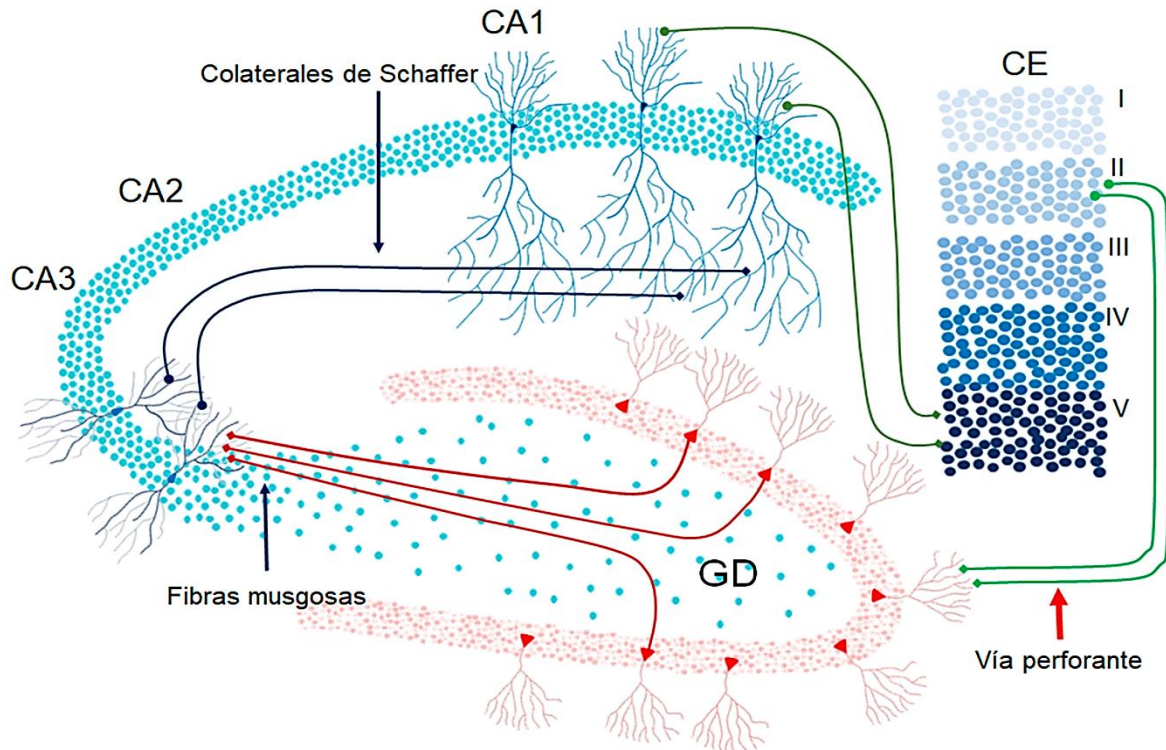


Figura 3. Estructura y anatomía del circuito neuronal del hipocampo. Se muestra en el esquema los circuitos neuronales del hipocampo. Las interacciones de los axones de la capa II de la CE con las células granulares del giro dentado por medio de la vía perforante. Las células granulares del giro dentado a través de las fibras musgosas interactúan con las dendritas apicales de las células piramidales de la región CA3. La región CA3 envía proyecciones ipsilaterales a las células piramidales de la región CA1 mediante las colaterales de Schaffer. Axones de la CE lateral y medial inervan directamente al árbol dendrítico apical de las regiones CA1 y CA3 respectivamente. La región CA3 es inervada por axones directos de la capa III de la CE lateral, mientras que las dendritas apicales de las neuronas piramidales de la región CA1 reciben axones directos de la capa II de la CE medial (Tomado y modificado de Li y cols., 2009).

1.3 Mecanismos moleculares en la plasticidad sináptica

Comprender la base material de la memoria sigue siendo un objetivo central de la neurociencia moderna. Desde hace tiempo se ha formulado la hipótesis de que las modificaciones en la plasticidad neuronal y la conectividad sináptica en el sistema nervioso central (SNC) podrían ser el sustrato necesario para la formación de la memoria (Routtenberg, 2013). La formación de la memoria se basa en la activación de varias cascadas moleculares a nivel neuronal, que en última instancia conducen a cambios de larga duración en la estructura y la función sináptica (Abraham y Robins, 2005; Rosenberg y cols., 2014; Ryan y cols., 2015). Las espinas dendríticas son especializaciones anatómicas que forman compartimentos y son

esenciales para la transmisión sináptica excitatoria (Bourne y Harris 2007; Govindarajan y cols., 2011). Los cambios en el número de espinas dendríticas, ya sea de nueva formación o eliminación, dependen de la síntesis o degradación de proteínas que conforman el citoesqueleto (Cingolani y Goda, 2008; Rosenberg y cols., 2014). Varios estudios *in vitro* han examinado las vías de señalización que conduce a la remodelación del citoesqueleto. Al igual que la mayoría de las cascadas de señalización, estas vías son muy complejas y dependen de la actividad de las proteínas postsinápticas, la polimerización y despolimerización de la actina (Sekino y cols., 2007; Cingolani y Goda, 2008). La regulación dinámica de la actina depende principalmente de los receptores ionotrópicos de glutamato, tales como los receptores a alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA) y N-metil-D-aspartato (NMDA) (Matus, 2005; Schubert, 2007).

La teoría que permite explicar el aprendizaje y la memoria en relación con la plasticidad neuronal es la potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD), que conducen a la expresión génica y la síntesis de proteínas (O'Keefe y Nadel, 1978; O'Keefe, 1979; Kandel, 2001; Barco y cols., 2006; Wang y cols., 2006). Los mecanismos moleculares y celulares que subyacen al aprendizaje y la memoria se han explicado mediante el uso de la LTP como modelo experimental. La LTP propone como ejecutor al neurotransmisor glutamato. El glutamato es liberado por la terminal presináptica y es reconocido por el receptor postsináptico AMPA que se activa y permite la entrada del ion sodio (Na^+). El incremento en la concentración de Na^+ favorece la despolarización de la membrana celular, que permite la remoción del ion magnesio (Mg^{2+}) que bloquea al receptor NMDA y en consecuencia su activación (Tsien, 2000; Dash y cols., 2004; Nakazawa y cols., 2004; Barco y cols., 2006; Wang y cols., 2006; Park y cols., 2013; Takeuchi y cols., 2013; Ryan y cols., 2015).

La activación del receptor NMDA favorece la entrada de Ca^{2+} en la terminal postsináptica. La entrada de Ca^{2+} estimula la unión de calcio/calmodulina a CaMKII, lo que provoca la translocación física de CaMKII a zonas de densidad postsináptica (PSD) por la unión al extremo C-terminal de las subunidades NR2B del receptor

NMDA en la sinapsis y favorece la translocación de las subunidades GluR1 y GluR2 del receptor AMPA a la zona de la densidad sináptica (Barco y cols., 2006; Bourne y Harris, 2007). El aumento en la concentración de Ca^{2+} además lleva a la activación de otras enzimas como la adenilato ciclasa (AC) presente en la membrana plasmática, que cataliza la conversión de adenosín trifosfato (ATP) a adenosín monofosfato cíclico (AMPc). El aumento en la concentración del segundo mensajero AMPc incrementa la fuerza sináptica a corto plazo (facilitación a corto plazo). El AMPc también activa a la proteína cinasa A (PKA) dependiente de AMPc, que permite mantener la actividad sináptica a largo plazo (Hayashi y cols., 2004; Wang y cols., 2004; Chen y cols., 2005).

La activación de PKA provoca que la subunidad catalítica se transloque al núcleo donde fosforila a CREB (proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc), iniciándose la síntesis de proteínas indispensables para la formación de nuevas interacciones sinápticas, implicadas en la consolidación de la memoria (Kandel, 2001; Barco y cols., 2006; Bourne y Harris, 2007). La fosforilación y la activación de los factores de transcripción como CREB, ZIF/268, C/EBP, NF- κ B (Romano y cols., 2006; Federman y cols., 2014; Guan y cols., 2015), que inducen la expresión de genes río abajo como *bdnf*, proteína asociada al citoesqueleto regulada por actividad (*arc*, también conocido como *arg 3.1*), *c-fos*, *zif-268* (también conocido como *zenk*, *egr-1*, *ngf-a*, *krox-24* y *tis8*) y *sintaxina1B*, son necesarios para la formación de la memoria a largo plazo (Dash y cols., 2004) (Figura 4).

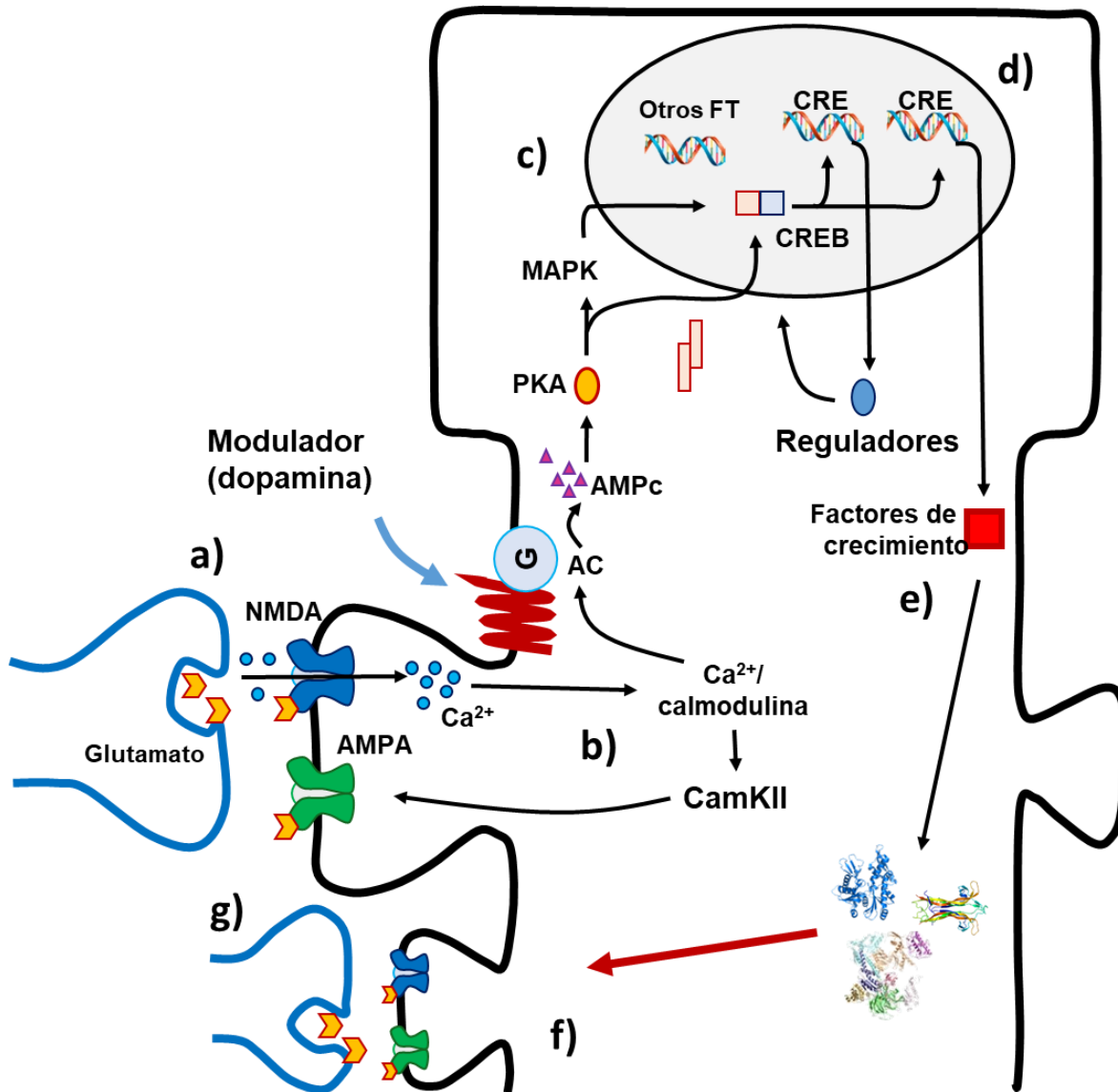


Figura 4. Mecanismos moleculares del aprendizaje y la memoria, y la potenciación a largo plazo. La LTP se puede describir como un proceso secuencial: a) liberación del neurotransmisor glutamato para la activación de los receptores postsinápticos; b) activación de cinasas y fosfatasa; c) transporte retrogrado de la información de la sinapsis al núcleo y activación de factores de transcripción e inducción de la expresión de genes; d) modificación de la cromatina y cambios epigenéticos; e) transcripción, traducción y síntesis de proteínas esenciales para la formación de nuevas sinapsis; f) activación de sinapsis silenciosas preexistentes; g) mecanismos de perpetuación y persistencia de la memoria (Tomado y modificado de Barco y cols., 2006).

1.4 Neurogénesis: un sustrato necesario en la formación de la memoria

Actualmente, se tiene evidencia de la formación de nuevas neuronas en el SNC adulto. Los trabajos de Altman proveen las primeras evidencias de nuevas células granulares en el hipocampo de rata en la etapa post-natal (Altman y Das, 1965). La integración funcional de nuevas neuronas en el SNC adulto fue demostrada por Paton y Nottebohn en 1984, en el estudio de la integración de nuevas neuronas durante el aprendizaje del canto de los pájaros. El estudio de la neurogénesis adulta se consolidó al integrar el uso de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), que es un análogo de la timina, como un trazador de proliferación celular (Kuhn y cols., 1996), esto permitió demostrar la proliferación celular y neurogénesis en la etapa adulta en casi todos los mamíferos examinados, incluidos los humanos (Eriksson y cols., 1998).

Las regiones clasificadas como neurogénicas implican la presencia de células precursoras inmaduras con un microambiente permisivo para la producción de nuevas neuronas (Gage, 2002; Zhong y Chia, 2008). La neurogénesis se define como el proceso de generación e integración de neuronas funcionales a los circuitos neuronales a partir de células progenitoras neuronales (CPN). Es un proceso complejo que involucra diversas etapas, como la proliferación de las células multipotenciales, migración, diferenciación, sobrevivencia e integración a los circuitos neuronales existentes (Ming y Song, 2005). La proliferación de las células progenitoras es heterogénea y mantiene un equilibrio homeostático (van Praag y cols., 1999; Alvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002; van Praag y cols., 2002; Ming y Song, 2005; Zhao y cols., 2008).

En el cerebro adulto se han identificado dos regiones neurogénicas: el sistema olfatorio, en la zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales (VL) y el hipocampo en la zona subgranular (ZSG) del GD (Ming y Song, 2011). En el sistema olfatorio, los precursores neuronales residen en la porción anterior de la ZSV en la pared de los VL. Estas células migran a lo largo de la vía migratoria rostral dentro del bulbo olfatorio, donde son diferenciadas a células granulares e interneuronas inhibitorias periglomerulares (Álvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002;

Kaneko y cols., 2010; Ihrie y Álvarez-Buylla, 2011). En el hipocampo, las células precursoras se encuentran en la ZSG del GD. Estas células surgen en la ZSG y migran dentro de las capas celulares granulares, donde maduran a células granulares excitatorias funcionales (Figura 5) (Zhao y cols., 2006; Ge y cols., 2008; Balu y Lucki, 2009).

Las CPN de la ZSG del GD son multipotenciales, muestran una característica morfológica muy parecida a la glía radial, con un soma triangular e incremento en el espesor de la porción apical que alcanza la capa granular celular donde se ramifica de forma masiva. Se pueden distinguir dos tipos de células de acuerdo con la orientación de la ZSG: astrocitos radiales y astrocitos horizontales (Seri y cols., 2004). Estos sólo expresan proteínas como nestina (filamento intermedio clase IV), y tienen propiedades de astrocitos que incluye la expresión de la proteína ácida glial fibrilar (GFAP), pero no la proteína S100 β , otra proteína específica de astrocitos. Estas células tienen alargamientos cortos de las fibras nerviosas en la ZSG y propiedades electrofisiológicas características (Filippov y cols., 2003; Fukuda y cols., 2003). En la fase de diferenciación y migración las células generadas expresan nestina y Sox2, pero no GFAP. Estas células son marcadas con BrdU frecuentemente, lo que indica una actividad mitótica (Taupin, 2006). Los grupos de células se extienden a lo largo de la ZSG y parte de estas células son destinadas a la integración en el circuito neuronal (Ge y cols., 2008; Balu y Lucki, 2009; Shu y cols., 2009; Ming y Song, 2011).

La siguiente clase de células son los neuroblastos, los cuales son precursores en la generación de nuevas neuronas granulares (Seri y cols., 2004). Las evidencias sugieren que las CPN se dividen y se diferencian a células post mitóticas que maduran a neuroblastos para formar neuronas granulares. Estas células tienen un soma largo, redondo u ovoide con extensiones citoplasmáticas y un patrón de características electrofisiológicas complejas claramente diferentes a los astrocitos (Filippov y cols., 2003). Estas células ya no expresan nestina o Sox2, sino que comienzan a expresar la PSA-NCAM (Seri y cols., 2004). Ambas subclases expresan a la proteína asociada a los microtúbulos DCX, presente en el inicio de la

diferenciación y migración, asociado únicamente con el linaje neuronal (Brown y cols., 2003) y Prox1, un factor de transcripción específico de las células granulares del giro dentado (Kronenberg y cols., 2003).

Las células granulares en diferenciación pasan por la fase transitoria de expresión de DCX y PSA-NCAM, específicas de neuroblastos. Los neuroblastos tienen las características de las neuronas granulares inmaduras, que incluyen ramificados prominentes, con frecuencia procesos radiales que se extienden a través de la capa de células granulares y proyectan dentro del *hilus* (Seri y cols., 2004). En ningún punto del tiempo se presenta una superposición entre marcadores y propiedades gliales o neuronales, lo que sugiere que las células precursoras de la ZSG pueden dar lugar a neuronas o células de la glía, lo cual es determinado a nivel de la célula progenitora quiescente o durante el proceso de amplificación (Shu y cols., 2009; Ming y Song, 2011).

La diferenciación post mitótica es caracterizada por una expresión transitoria de DCX, la proteína de unión a calcio Calretinina y la expresión de los marcadores neuronales NeuN y Calbidina (Kempermann y cols., 2004). La formación de las dendritas y del axón se presenta durante el período que incluye la aparición transitoria de dendritas basales. La elongación del axón ocurre rápidamente y forma conexiones apropiadas a CA3, las cuales son establecidas dentro de los días 4 a 10 después del nacimiento. Durante la primera etapa de maduración las neuronas presentan una alta resistencia y baja capacitancia de la membrana (Esposito y cols., 2005; Ge y cols., 2008), y empiezan a recibir proyecciones sinápticas funcionales de tipo GABAérgicas, pero no glutamatérgicas. Estas células son excitadas por GABA, el cual es esencial para el establecimiento de sinapsis de tipo glutamatérgico y GABAérgico, para la regulación del desarrollo dendrítico (Esposito y cols., 2005).

Durante la segunda y tercera semana de maduración, las nuevas neuronas exhiben propiedades electrofisiológicas comparables, pero no similares a las neuronas maduras. Se ha descrito que las inervaciones glutamatérgicas aparecen entre los días 14 y 18, con la formación de espinas dendríticas y un continuo crecimiento dendrítico (Esposito y cols., 2005; Ge y cols., 2008; Zhao y cols., 2006).

Cuatro semanas después de la división las nuevas células granulares pueden generar potenciales de acción, muestran respuestas electrofisiológicas muy similares a las células maduras de su alrededor y son integradas en el circuito hipocampal (van Praag y cols., 2002). Las nuevas neuronas muestran un bajo umbral para la inducción de la LTP (Schmidt-Hieber y cols., 2004).

El proceso de neurogénesis es regulado con el fin de mantener la población de células multipotenciales, modular la proliferación, la migración neuronal y mantener los circuitos neuronales funcionales. La completa integración de las nuevas neuronas requiere el establecimiento de conexiones sinápticas aferentes y eferentes dentro del circuito neuronal. Los neurotransmisores GABA y glutamato favorecen la completa integración de las nuevas neuronas maduras en el SNC adulto (Tashiro y cols., 2006; Ge y cols., 2008; Balu y Lucki, 2009; Li y cols., 2009; Shu y cols., 2009; Ming y Song, 2011).

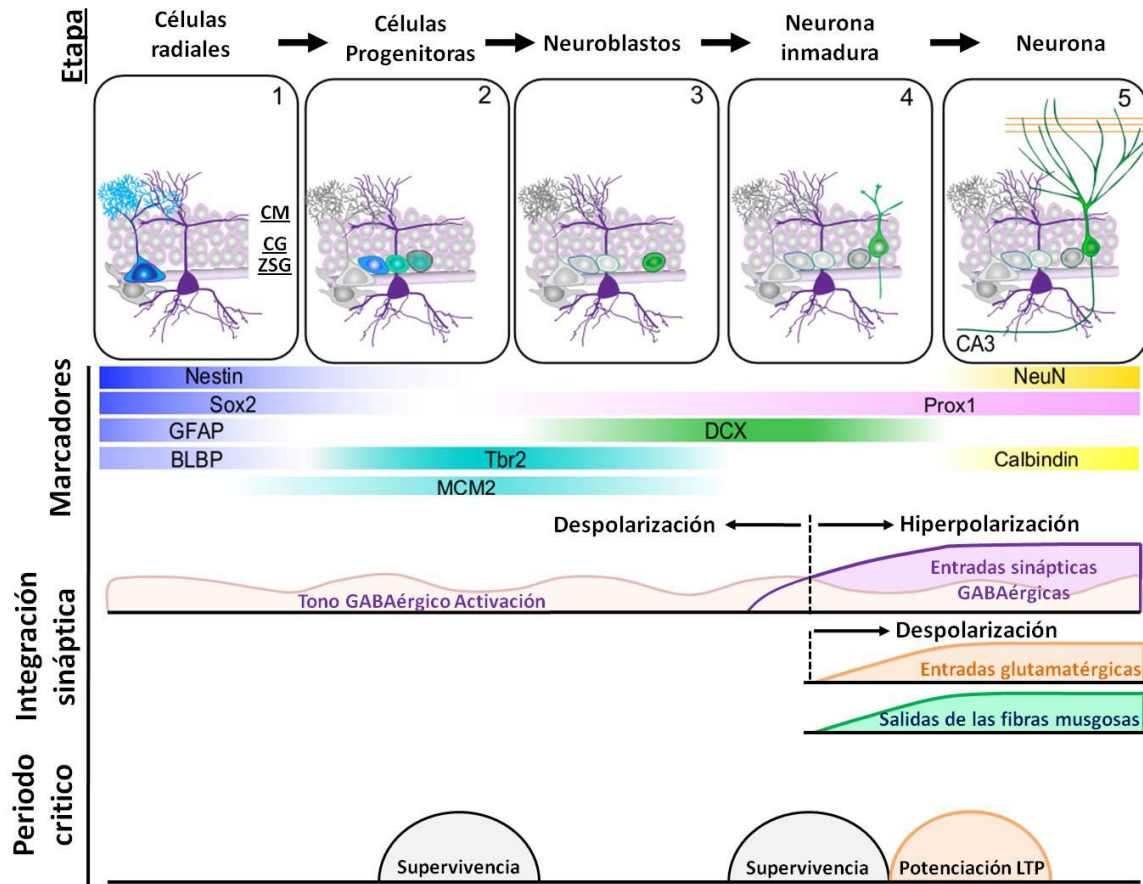


Figura 5. Neurogénesis en la etapa adulta en la región del giro dentado de la formación del hipocampo. Resumen de las 5 etapas del desarrollo durante la neurogénesis: 1) activación de las células quiescentes radial similar a la glía en la ZSG; 2) proliferación de precusores no radiales y progenitores intermedios; 3) generación de neuroblastos; 4) integración de neuronas inmaduras; y 5) maduración de las nuevas células granulares dentadas. Se muestra la expresión de marcadores en estado-específicos, neurotransmisión, procesos secuenciales de integración sináptica y periodos críticos de regulación, supervivencia y plasticidad. CM: capa molecular; CG: células granulares; ZSG: zona subgranular; GFAP: proteína ácida glial fibrilar; BLBP: proteína de unión a lípidos del cerebro; DCX: doblecortina; NeuN: proteína neuronal específica; LTP: potenciación a largo plazo (Tomado y modificado de Ming y Song, 2011).

Experimentalmente la inducción de la LTP en la vía perforante incrementa la proliferación neuronal en GD, de una manera dependiente del receptor NMDA (Bruel-Jungerman y cols., 2006; Chun y cols., 2006). La actividad de CREB regula la transcripción de genes que codifican a proteínas como Pax6, doble cortina (DCX) (Koizumi y cols., 2006) y moléculas de adhesión celular neuronal polisialilada (PSA-NCAM) (Battista y Rutishauser, 2010; Herold y cols., 2011), que participan en el control de la migración y la diferenciación (Chiaramello y cols., 2007). La LTP inducida por tareas de aprendizaje y que tienen una demanda importante de los

circuitos neuronales del hipocampo, favorecen el proceso de neurogénesis en el GD (Brüel-Jungeman y cols., 2006; Deng y cols., 2009, 2010; Lemaire y cols., 2012). Actualmente se ha demostrado que el proceso de aprendizaje requiere de la integración de nuevas neuronas como un sustrato necesario para la formación de la memoria y que esta integración es favorecida por la LTP (Dupret y cols., 2008; Lemaire y cols., 2012). La neurogénesis en el hipocampo adulto proporciona un uso dinámico y flexible de la información adquirida, la separación de patrones, la prevención de interferencias, la flexibilidad del comportamiento conductual y finalmente la resolución de la memoria (Aimone y cols., 2010, 2011).

Recientes evidencias demuestran que la tarea de aprendizaje en el laberinto acuático de Morris induce sinaptogénesis (Ramírez-Amaya y cols., 1999; Ramírez-Amaya y cols., 2001), así como neurogénesis en el GD (Dupret y cols., 2007; Dupret y cols., 2008; Ge y cols., 2008). Se ha propuesto que la velocidad de neurogénesis está relacionada directamente con la capacidad de aprendizaje (Leuner y cols., 2004). El aprendizaje induce un efecto positivo sobre las neuronas en diferenciación, ya que promueve el incremento en la longitud dendrítica y el número de espinas (Lemaire y cols., 2012). La integración de nuevas neuronas permite separar, organizar y codificar la información durante el aprendizaje espacial (Dupret y cols., 2008; Clelland y cols., 2009; Aimone y cols., 2010, 2011). Se ha planteado una relación entre la disminución en el proceso de neurogénesis en enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer (EA), y la pérdida de la capacidad para formar nuevas memorias a largo plazo (Rodríguez y Verkhatsky, 2011). Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos implicados entre el déficit cognitivo y la disminución en la neurogénesis.

Las neuronas granulares maduras del GD proyectan las fibras musgosas a las células piramidales región CA3 del hipocampo; las terminales musgosas coliberan glutamato, zinc y neuropéptidos, mientras que las terminales de filopodios de las fibras musgosas hacen contacto con interneuronas inhibitorias. En el GD se reclutan del 2 al 3% de las unidades neuronales durante el procesamiento de información espacial, lo que refleja un código escaso, con el cual es más viable una óptima

separación de patrones, ya que es menos probable reclutar al mismo engrama durante el aprendizaje en diferentes representaciones (Kesner, 2013a, 2013b). La región CA3 proyecta aferencias a las células piramidales de CA1, y fibras colaterales recurrentes que hacen contacto con otras células piramidales en la CA3, en un fascinante gradiente próximo-distal y septo-temporal (Kesner, 2007; Carasatorre y cols., 2016).

Se ha propuesto que la inervación del GD a CA3 de entre 10 a 18 sinapsis musgosas hacen contacto con cada célula piramidal, mientras que el número de sinapsis por célula piramidal de vías más débiles, como las colaterales del CA3 o las vías provenientes del CA1, están en el orden de los miles. Por lo tanto, se ha propuesto que las fibras musgosas dirigen el almacenamiento de nuevas representaciones, mientras la vía perforante transmite la clave de información que inicia la recuperación de representaciones previamente almacenadas. Gracias a sus conexiones recurrentes, la región CA3 lleva a cabo la comparación estadística de patrones, completando los patrones de actividad para reconocer así lo familiar o separándolos cuando las representaciones son diferentes (Kesner, 2007, 2013a; 2013b; Carasatorre y cols., 2016).

1.5 La enfermedad de Alzheimer

Las demencias degenerativas son enfermedades irreversibles que afectan a 35.6 millones de personas en el mundo. La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más frecuente de demencia y la más prevalente entre los ancianos. Los pacientes con la EA representan aproximadamente el 10% de la población mayor a 65 años y hasta el 50 % de la población mayor a 85 años. La EA se caracteriza por la presencia de dos marcadores histológicos: las placas seniles o placas neuríticas (PNs) y las marañas neurofibrilares (MNF) (Selkoe, 2001; Matson, 2004).

Las PNs están formadas por la agregación del péptido amiloide beta ($A\beta$), mientras que las MNF son producto de la hiperfosforilación de la proteína Tau (Walsh y Selkoe, 2004). La agregación de las PNs y las MNF se presentan principalmente en el hipocampo, la corteza frontal y la amígdala, estructuras cerebrales relacionadas estrechamente con el aprendizaje y la memoria (Selkoe, 2001; Matson, 2004; Tanzi y Bertram, 2005) (Figura 6). Además de los marcadores clásicos de la EA, la degeneración sináptica es una de las principales características que es asociada al déficit cognitivo, incluso antes de que exista muerte neuronal (Knobloch y Mansuy, 2008; Yu y Lu, 2012).

En los últimos años, se ha reportado que en los cerebros de los pacientes con la EA se presenta un proceso inflamatorio de tipo crónico. Se ha propuesto la hipótesis de que existe una relación íntima entre el $A\beta$ y la neuroinflamación, como uno de los principales detonantes de la EA. Los estudios clínico-patológicos y de neuroimagen revelan una intensa actividad de los astrocitos y la microglia en la periferia de las PNs (McGeer y McGeer, 2001; Eikelenboom y van Gool, 2004), además de observar el aumento de los mediadores proinflamatorios (Heneka y cols., 2014) (Figura 6).

Los agregados de péptido $A\beta$ interactúan con receptores de reconocimiento de patrones (PRR) expresados en microglia y astrocitos que inician una respuesta inmune innata. Este proceso implica la secreción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas que contribuyen a una respuesta inmune desregulada que provoca la neurodegeneración (Fernández-Vizarra y cols., 2004; Griffin y Barger, 2010). La

neuroinflamación ha sido asociada durante mucho tiempo a la patología de la EA, aunque su contribución en la progresión de la enfermedad aún no se comprende. Actualmente la respuesta inflamatoria se considera un marcador histopatológico para el diagnóstico de la EA (Heneka y cols., 2015).

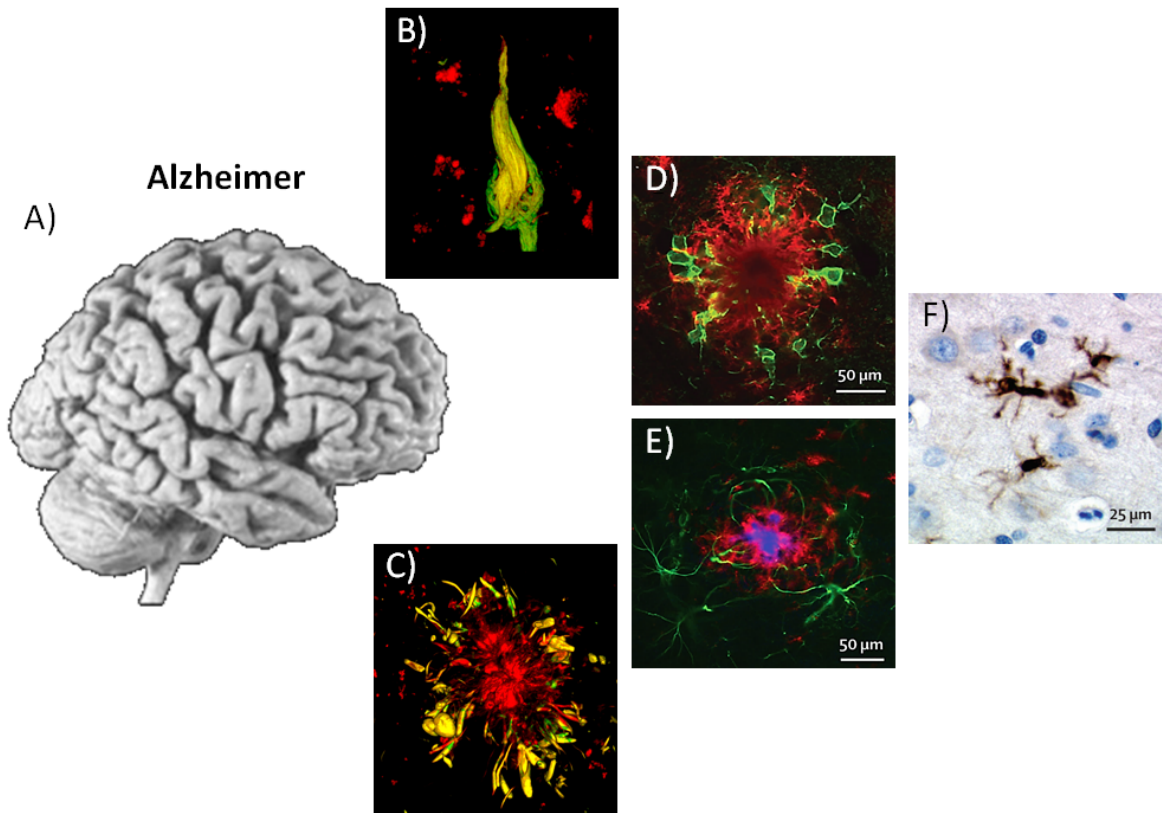


Figura 6. Marcadores histopatológicos en la EA. En A) se muestra el cerebro de un paciente con la EA. Las fotomicrografías muestran en B) a las marañas neurofibrilares (color verde) y en C) se muestra una placa neurítica (color rojo) de la corteza cerebral de un paciente con la EA. En D) se muestra la fotomicrografía de las células de la microglia (marcador Iba1, color verde) en la periferia de una placa neurítica (color rojo). En E) se muestra la fotomicrografía donde se identificó a los astrocitos (marcador GFAP, color verde) en la periferia de una placa neurítica (color rojo). En F) se evaluó la expresión de la citocina proinflamatoria IL-1 β , la cual se muestra presente en células de la microglia. Las fotomicrografías fueron tomadas por microscopia confocal (Tomado y modificado de Guevara y cols., 2004; Heneka y cols., 2015).

1.6 La inflamación como un mecanismo de toxicidad del amiloide- β

Las PNs están formadas por una combinación heterogénea de péptidos A β desde 20 a 43 aminoácidos, sin embargo, los de 42 y 43 aminoácidos son los depósitos extracelulares más abundantes del péptido A β . Los depósitos del péptido A β de 40 a 42 aminoácidos (A β_{1-42}) forman una estructura fibrilar insoluble, que se asocia a la degeneración neuronal (Selkoe, 2008). El péptido A β de 40-42 aminoácidos se forma por la escisión secuencial de la proteína precursora del amiloide (PPA), la cual es una glicoproteína transmembranal de tipo I. El dominio N-terminal es extracelular y el dominio C-terminal se localiza en el citoplasma. El gen que codifica para la PPA está localizado en el cromosoma 21. La PPA presenta cuatro isoformas que corresponden a la PPA 695, 714, 751 y 770 aminoácidos, la isoforma más común es la de la PPA de 695 aminoácidos (Figura 7). Su función aún no está elucidada, aunque se ha implicado como regulador de la formación de la sinapsis, plasticidad neuronal y exportación de hierro (Turner y cols., 2003; Priller y cols., 2006; Duce y cols., 2010).

La PPA está sujeta a la proteólisis por diversas proteínas denominadas α -secretasa, β -secretasa y γ -secretasa (Figura 7). El corte de la PPA por la α -secretasa impide la generación del A β , debido a que el sitio de corte se encuentra dentro del dominio A β y es denominada vía no-amiloidogénica (Selkoe, 2001). El resultado del corte proteolítico por la α -secretasa es la liberación de un ectodominio soluble de la PPA denominado sPPA α y un fragmento C-terminal de 83 aminoácidos. La β -secretasa realiza un corte proteolítico de la PPA lo que genera el extremo N-terminal, denominado sPPA β y el extremo C-terminal de 99 aminoácidos (C99) permanece anclado a la membrana (Blennow y cols., 2006). Posteriormente la γ -secretasa, corta la parte transmembranal del dominio C99, en los aminoácidos 40 o 42 que corresponde al dominio C-terminal del péptido A β . El corte por la γ -secretasa genera el péptido A β de 40 a 42 aminoácidos y el péptido citoplasmático AICD (dominio intracelular carboxílico del amiloide), esta ruta de síntesis es conocida como la vía amiloidogénica (Selkoe, 2001; Blennow y cols., 2006).

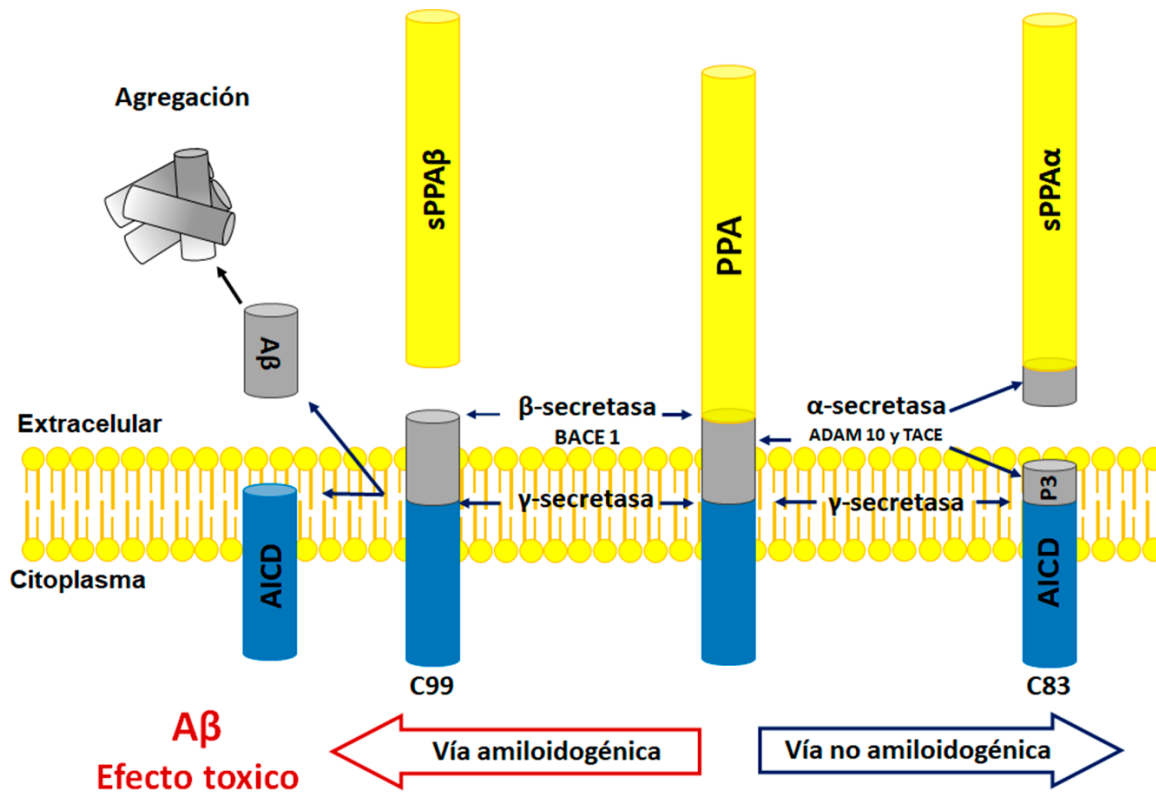


Figura 7. Metabolismo de la PPA. En la vía no amiloidogénica, la PPA es procesada por el corte proteolítico de la α- secretasa en el dominio Aβ, formando sPPAα y un fragmento c-terminal unido a la membrana. En la vía amiloidogénica, la PPA es secuencialmente sometida al corte proteolítico por acción de la β- y γ-secretasa para formar el péptido Aβ. El corte de la β- secretasa corta a la PPA para generar el fragmento sPPAβ y un fragmento unido a la membrana AICD. (Tomado y modificado de Mu y Gage, 2011).

Las evidencias muestran que las altas concentraciones y la agregación del péptido Aβ son un factor detonante de la toxicidad en la EA (Pike y cols., 1993; Mattson, 2004). Los eventos neurodegenerativos aparecen en la corteza transentorrinal, corteza entorrinal y el hipocampo, que conllevan a la disfunción sináptica y cognitiva (Walsh y Selkoe, 2004). En la EA una de las características principales es el daño en la memoria, por la pérdida crónica y progresiva de neuronas de la formación hipocampal (Mattson, 2004; Heneka y cols., 2015). En la formación hipocampal se localiza el GD, uno de los dos nichos neurogénicos del cerebro adulto, que favorece la generación, diferenciación e integración de nuevas neuronas funcionales para la formación de la memoria (Ge y cols., 2008).

Los estudios post mortem realizados en cerebros de pacientes con EA han demostrado un incremento en el proceso de neurogénesis, sin embargo, a largo

plazo se manifiesta una depleción en la integración de nuevas neuronas (Jin y cols., 2004; Rodríguez y Verkhratsky, 2011). Actualmente no se ha descrito por completo la implicación de la neurogénesis en la formación de la memoria y su alteración en etapas tempranas de la EA. Diversos mecanismos se han propuestos para explicar el efecto neurotóxico del péptido A β : 1) la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS); 2) la inducción de la entrada masiva y acumulación de Ca $^{2+}$ intracelular; 3) la alteración en la fluidez de la membrana por lipoperoxidación; y 4) la inducción del proceso de neuroinflamación (Figura 8) (Selkoe, 2001; Hardy y Selkoe, 2002; Zheng y cols., 2002; De Felice y cols., 2007; Shankar y cols., 2007; Limón y cols., 2009).

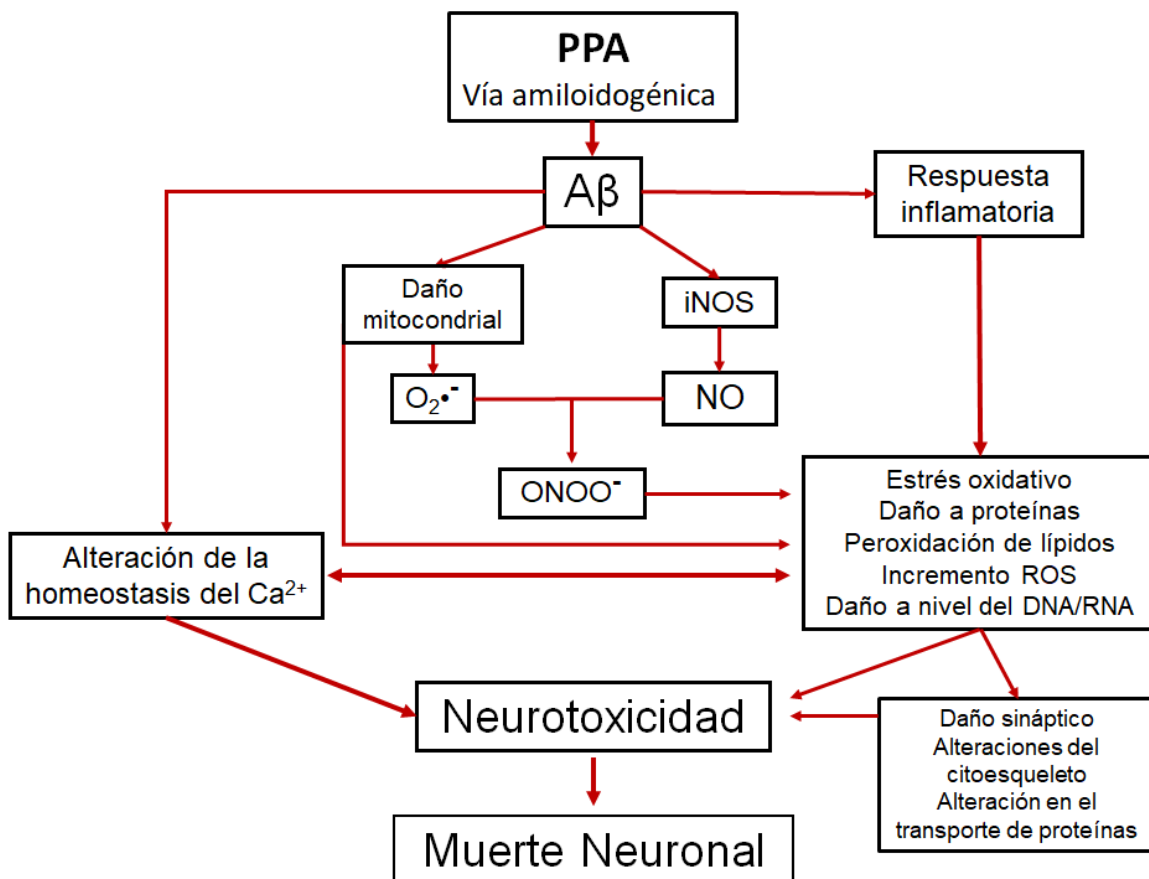


Figura 8. Mecanismos moleculares de toxicidad del péptido A β . Los principales mecanismos de daño del péptido A β son: desequilibrio en la homeostasis de Ca $^{2+}$, disfunción mitocondrial que conlleva al estrés oxidativo e inducción de una respuesta inflamatoria que conlleva a una muerte neuronal y en consecuencia a una neurodegeneración (Tomado y modificado de Butterfield y cols., 2001).

Se ha propuesto que uno de los principales mecanismos de daño del péptido A β es la inducción de una respuesta inflamatoria, que conlleva a un daño neuronal latente en los cerebros de los pacientes con la EA (Heneka y cols., 2010; Maccioni, 2010). El péptido A β tiene la capacidad de activar a los astrocitos y la microglia a través de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) y el receptor a IL-1 (IL-1R), que induce un incremento de citocinas, quimiocinas y generación de especies reactivas de oxígeno. La sobreproducción de estos factores conlleva a una desregulación de la respuesta inmune que contribuye a la neurodegeneración (Su y cols., 2016). Esto sugiere que la inflamación es un factor crítico que contribuye a la degeneración neuronal y posiblemente sea el detonante del deterioro cognitivo en la EA. Sin embargo, las evidencias descritas aún no son del todo claras. Es necesario desarrollar más estudios con otros modelos experimentales, que permitan comprender mejor la participación del proceso inflamatorio en la degeneración neuronal y el deterioro cognitivo que induce el A β a largo plazo.

1.7 El péptido amiloide- β_{25-35} como un modelo para estudiar la enfermedad de Alzheimer

El empleo del péptido A β como un modelo de estudio *in vitro* e *in vivo* ha demostrado que el estado oligomérico y prefibrillas tienen una actividad neurotóxica (Walsh y Selko, 2004; Selkoe, 2008). Los agregados del péptido A β_{1-40} y A β_{1-42} son los fragmentos más predominantes en los pacientes con la EA (Sakono y Zako, 2010; Glenner y Wong, 2012), sin embargo, estos agregados también contienen péptidos con secuencias de oligómeros truncados como el A β_{25-35} o el A $\beta_{25-35/40}$ (Kubo y cols., 2002; Gruden y cols., 2007). La fracción 25-35 del A β (A β_{25-35}) se ha propuesto como la parte más tóxica del péptido completo, ya que es capaz de agregarse rápidamente e inducir neurotoxicidad de forma inmediata (Pike y cols., 1993; Pike y cols., 1995; Harkany y cols., 1998; Selkoe, 2001). El péptido A β_{25-35} está formado por 11 aminoácidos (GSNKGAIIGLM) y se localiza en el extremo C-terminal de la secuencia de aminoácidos del A β . El péptido A β_{25-35} mantiene la capacidad de generar los efectos neurotóxicos del péptido completo 1-40 o 1-42 (Pike y cols., 1993; Yamada y Nabeshima, 2000; Zussy y cols., 2011; Zussy y cols., 2013).

Se ha propuesto al péptido $A\beta_{25-35}$ como un modelo en el estudio de las etapas tempranas en la EA (McDonald y Overmier, 1998; Gulyaeva y Stepanichev, 2010; Zussy y cols., 2013). Los mecanismos neurotóxicos del péptido $A\beta_{25-35}$ hacen referencia a una desregulación de la neurotransmisión glutamatergica (Figura 9). El $A\beta_{25-35}$ tiene la capacidad de regular el tráfico de receptores AMPA hacia la membrana postsináptica. Los AMPARs son esenciales para los eventos de plasticidad dependientes de la LTP y la LTD implicados en la formación de la memoria (Parameshwaran y cols., 2008) que causa retracción axonal y dendrítica, seguida de la muerte neuronal (Yanker y cols., 1990; Lazcano y cols., 2014). Los efectos neurotóxicos del péptido $A\beta_{25-25}$ son mediados por la activación de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDAR), ya que generan un desequilibrio en la homeostasis del Ca^{2+} (Harkany y cols., 2000).

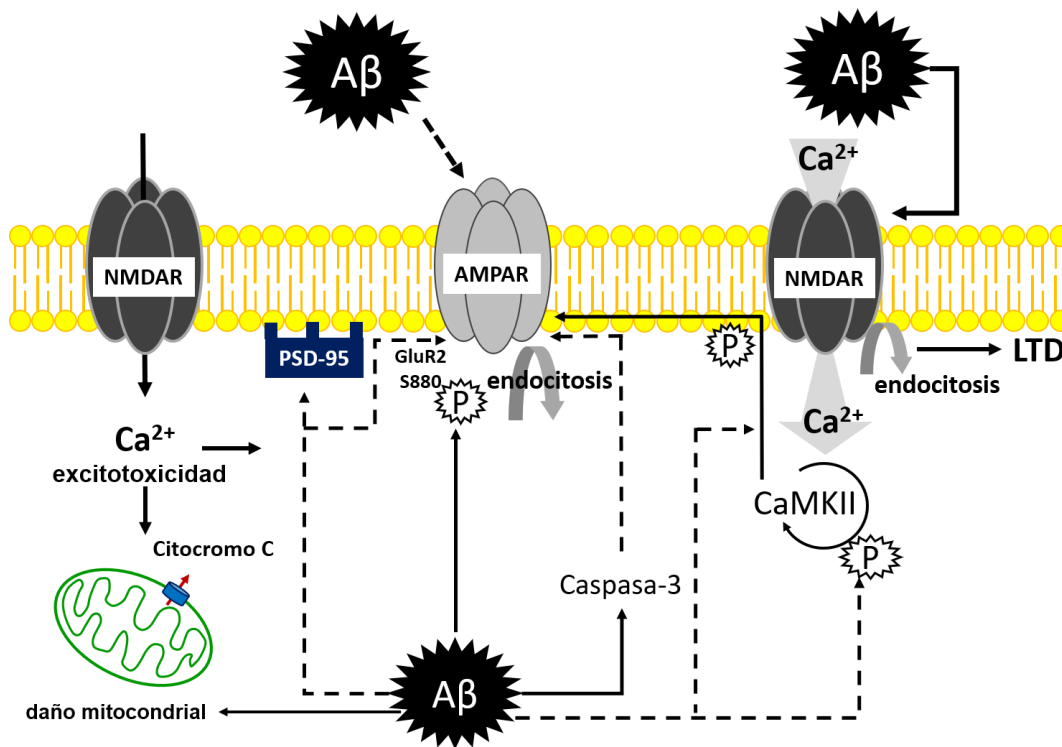


Figura 9. El $A\beta$ modula la expresión y funcionalidad de los receptores AMPA y NMDA. El $A\beta$ modula a los canales AMPA por un proceso de proteólisis mediante caspasa-3 e inhibe la autofosforilación de CaMKII, así que CaMKII fosforila al receptor AMPA. El $A\beta$ facilita la fosforilación del receptor AMPA en S880 de la subunidad GluR2 y promueve su endocitosis, e induce una reducción de PSD-95 y de la subunidad GluR2 en el receptor NMDA. El $A\beta$ promueve la entrada de Ca^{2+} a través de su interacción con el receptor NMDA que conlleva a excitotoxicidad, daño mitocondrial y en consecuencia muerte neuronal por apoptosis. Se presentan los procesos facilitadores (líneas continuas) e inhibidores (líneas punteadas) (Tomado y modificado de Parameshwaran y cols., 2008).

El incremento en la concentración de Ca^{2+} conlleva a excitotoxicidad e incremento en las especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS). Los radicales libres más importantes que participan en el estrés oxidativo son el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y el óxido nítrico (NO^{\cdot}). La entrada masiva de Ca^{2+} inducida por el péptido $\text{A}\beta_{25-35}$ activa a la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) e incrementa los niveles de NO^{\cdot} . El daño generado por el péptido $\text{A}\beta_{25-35}$ a nivel mitocondrial favorece la reacción de e^- con el O_2 e inducen la producción del anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). El $\text{O}_2^{\cdot-}$ y el NO^{\cdot} reaccionan formando peroxinitrito (ONOO^-), que con CO_2 forman nitroso-peroxi carbonato (ONOOCO_2^-) que al romperse de manera homolítica genera el radical carbonato ($\text{CO}_3^{\cdot-}$) y dióxido de nitrógeno (NO_2^{\cdot}) (Halliwell, 2006).

El NO_2^{\cdot} y ONOO^- reaccionan con proteínas, lo cual deriva en la nitración de residuos de tirosina formando 3-nitrotirosina (3-NT), y en consecuencia la proteína pierde su conformación y función. El anión NO_2^- , generado por la estabilización del NO^{\cdot} , es una especie cuantificable y se ha demostrado que el péptido $\text{A}\beta_{25-35}$ puede generar un incremento de NO_2^- (Limón y cols., 2009; Díaz y cols., 2011, 2012). La formación de ROS y RNS generan un incremento en la lipoperoxidación y nitración de proteínas (Vardarajan y cols., 2001; Limón y cols., 2009; Carrillo-Mora y cols., 2014; Limón y cols., 2011). El daño oxidativo generado sobre las neuronas por la agregación del $\text{A}\beta$ induce la activación de las células gliales que llevan a un proceso de neuroinflamación (Varadarajan y cols., 2001; Sofroniew y Vinters, 2010; Díaz y cols., 2012).

La neuroinflamación por el péptido $\text{A}\beta_{25-35}$ promueve la astrogliosis reactiva y la liberación de citocinas proinflamatorias como la IL-1 β , IL-6, IL-17 y TNF- α , en donde la sobreexpresión de las citocinas proinflamatorias podría activar los mecanismos de neurodegeneración y en consecuencia causar el deterioro cognitivo (Rosales-Corral y cols., 2004; Chiarini y cols., 2010; Díaz y cols., 2012). Sin embargo, si el estímulo inflamatorio persiste pueden activar los mecanismos de neurodegeneración y muerte neuronal (Swanson y cols., 2004; Whitney y cols.,

2009; Heneka y cols., 2015). Cabe mencionar que en los modelos *in vivo* aún no se demuestran con claridad los mecanismos moleculares de la inflamación que participan en respuesta a la toxicidad del A β ₂₅₋₃₅, los cuales podrían estar vinculados con la neurodegeneración y el deterioro cognitivo presente en la EA.

1.8 El péptido A β y la neuroinflamación como un factor clave en la neurodegeneración

La neuroinflamación se define como la respuesta inmune que activa a las células gliales (astrocitos y microglia). La actividad de astrocitos y microglia ocurre bajo un proceso regulado con la finalidad de proteger la integridad estructural y funcional de las células. Sin embargo, la actividad de la microglia y astrocitos en un intento ineficaz de eliminar los agregados del péptido A β provocan un incremento exacerbado de citocinas y quimiocinas proinflamatorias (Heneka y cols., 2014; Heneka y cols., 2015; Latta y cols., 2015). El incremento de citocinas proinflamatorias y el daño neuronal generan un estado reverberante que desencadenan una reactividad microglial y astrocítica deletérea (Doody y cols., 2013; Salloway y cols., 2014; Sofroniew y cols., 2014; Kirkley y cols., 2017).

Se ha demostrado la localización de la microglia y astrocitos en las proximidades de las placas seniles, donde el péptido A β puede activar a las células gliales a través de los receptores Toll Like (TLR) 2, 4 y 9. Después de la estimulación, a partir de los TLR se desencadena una cascada de señalización que involucra a MyD88 y la activación de factores de transcripción como el factor nuclear kappa B (NF- κ B) y la proteína activadora 1 (AP-1) (Moynagh, 2005; Lee y Kim, 2007). En consecuencia, se agrava aún más el daño neuronal por la promoción de factores proinflamatorios como IL-1 β TNF- α e IFN- γ (Figura 10) (Whitney y cols., 2009; Lee y cols., 2010; Heneka y cols., 2015).

La actividad de la microglia es de naturaleza pleiotrópica, que depende de los factores del microambiente inflamatorio en el que se recluta. La microglia presenta la capacidad de polarizar su fenotipo funcional a un fenotipo M1 (inflamatorio) o M2 (antiinflamatorio). En condiciones tróficas la microglia desempeña un papel importante en el mantenimiento de la comunicación sináptica,

plasticidad neuronal y reparación neuronal a través de la secreción del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Ji y cols., 2013; Parkhurst y cols., 2013).

Alternativamente, dentro de un entorno proinflamatorio, la actividad de la microglia parece tener un efecto degenerativo sobre la diferenciación y maduración de las células progenitoras neurales, la formación de sinapsis y la plasticidad neuronal (Bastos y cols., 2008; Deng y cols., 2010; Lynch, 2010). La activación de microglia por IFN- γ , TNF α , ligandos de TLR o A β desencadenan la activación clásica y proinflamatoria de la microglia (Takeda y Akira, 2004; Lotz y cols., 2005; McGeer y McGeer, 2010), que conlleva a un incremento en la actividad de iNOS, IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF α y quimiocinas que promueven la neurodegeneración (Hu y cols., 2012; Graciuc, y cols., 2013).

La activación de la microglia induce la proliferación de astrocitos. Los astrocitos son las células gliales más abundantes en el SNC, constituyen más del 25 % del volumen total del cerebro y son cruciales para mantener una estructura y función saludable del cerebro. Cumplen importantes funciones dentro del SNC: ellos proveen soporte físico y metabólico a las neuronas, participan en la formación y mantenimiento de la barrera hematoencefálica, producen factores neurotróficos y neuroprotectores como el BDNF, y participan en procesos de reparación dentro del SNC (Ávila-Muñoz y Arias, 2014).

Los astrocitos son reguladores clave en la respuesta inflamatoria, y la astrogliosis reactiva se manifiestan por un incremento en el número, tamaño y motilidad de los astrocitos, que rodean las placas seniles característica de la EA (Sofroniew, 2014; Heneka y cols., 2015). En respuesta a la agregación del péptido A β los astrocitos desencadenan respuesta inflamatoria marcada, mediante la expresión de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, principalmente las citocinas IL-1 β , IL-6 TNF α , IFN γ , y TGF β (Nagele y cols., 2003; Morales y cols., 2014). La actividad de los astrocitos se ha considerado un factor clave que conlleva a la neurodegeneración.

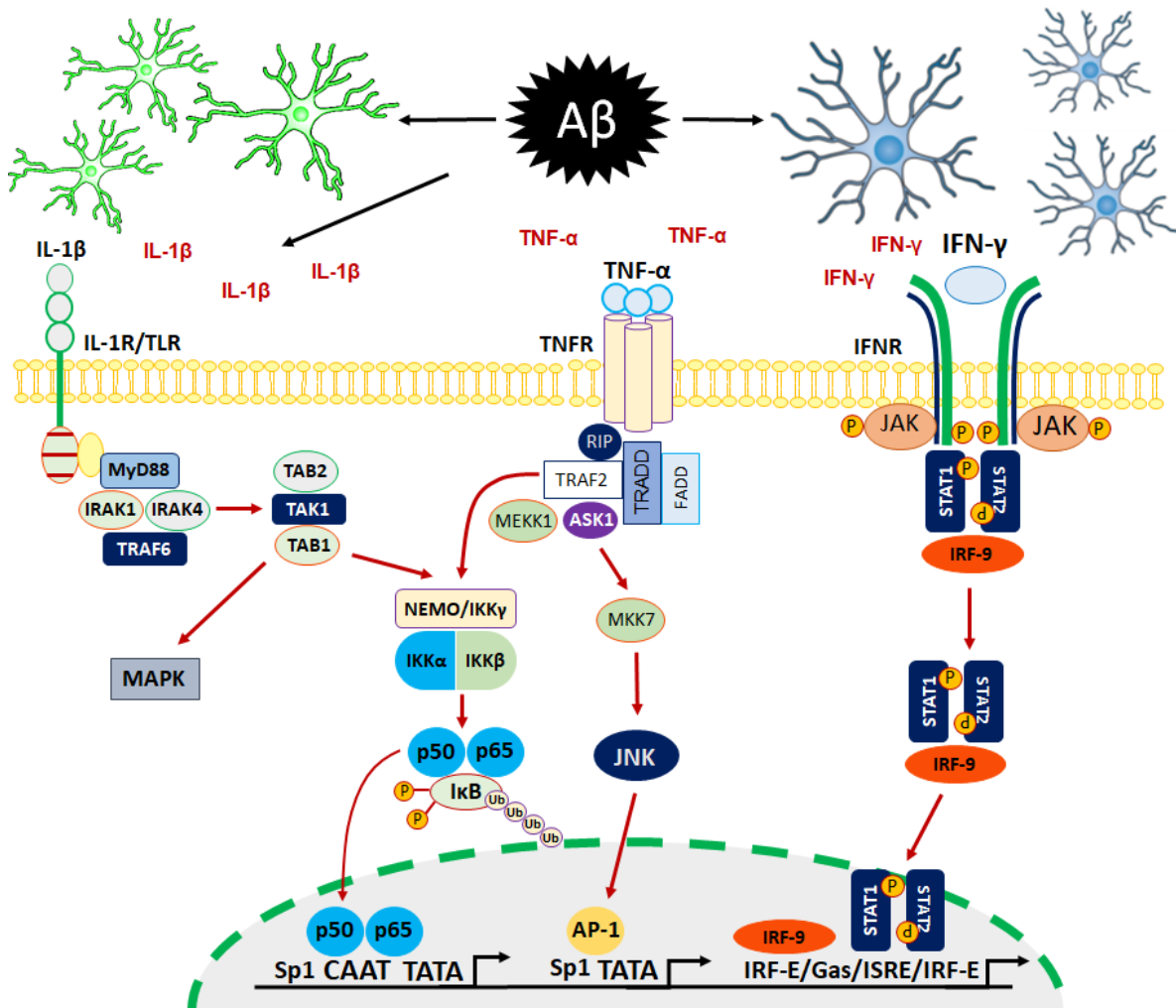


Figura 10. El péptido Aβ promueve la actividad de astrocitos y microglia. El Aβ induce la activación de astrocitos y microglia a través de los receptores TLR 2, 4 y 9, IL-1R, que en un intento de eliminar los agregados de Aβ induce una la respuesta inflamatoria a través de la secreción de citocinas proinflamatorias como IL-1β, TNF-α e INF-γ, entre otros. La actividad de estas citocinas promueve la translocación de los factores de transcripción NF-κB, AP-1 e IRF-9 presentes en el citoplasma al núcleo, y en consecuencia favorecen la transcripción de genes implicados en la modulación de la neuroinflamación, generando un microambiente reverberante y daño neuronal.

Los astrocitos pueden ser más eficientes en la captación del Aβ₁₋₄₂ que la microglia (Wyss-Coray y cols., 2003; Nielsen y cols., 2010) y muestran preferencia por la captación del Aβ en forma de oligómero en lugar de fibrillas (Guénette, 2003; Nicoll y Weller, 2003). Al igual que la microglia, los astrocitos activados producen numerosas moléculas proinflamatorias, una de ellas es la S100β y GFAP, las cuales son altamente expresada por astrocitos reactivos. La actividad prolongada de los astrocitos genera un daño neuronal que genera a su vez un deterioro cognitivo.

Se ha demostrado que la administración del péptido A β ₂₅₋₃₅ en corteza cerebral induce la activación de la microglia y astrocitos (Díaz y cols., 2012), los cuales promueven la liberación de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-17 e incrementan las RNS. El incremento conlleva a la neurodegeneración y en consecuencia causan la muerte neuronal (Rosales-Corral y cols., 2004; Swanson y cols., 2004; Chiarini y cols., 2010; Díaz y cols., 2012). Sin embargo, la respuesta inflamatoria en el proceso neurodegenerativo aun no es clara (Amor y cols., 2010; Glass y cols., 2010), lo que hace preguntarnos si la inflamación es la causa de la EA.

1.9 Galectinas: moduladores del proceso de inflamación

Comprender las interacciones entre el sistema inmune y el sistema nervioso podría ser clave para prevenir o retrasar las enfermedades neurodegenerativas. Las interacciones específicas entre las moléculas expresadas en la superficie de las células o sustratos potenciales de adhesión (ligandos) son importantes mecanismos de la comunicación célula-célula y célula-matriz extracelular. En el presente trabajo proponemos que los cambios en la glicosilación de proteínas son críticos en la señalización de la respuesta inmune innata y adaptativa (van Kooyk y Rabinovich, 2008; Rabinovich y cols., 2012, Rabinovich y Croci, 2012).

La glicosilación de proteínas es una modificación co- y postraduccional que regula el plegamiento y función de la mayoría de las proteínas, y es vital para muchas funciones cerebrales, incluido el aprendizaje y la memoria (Kleene y Schachner, 2004). Se conocen dos tipos principales de glicosilación en la vía secretora: la N-glicosilación, que inicia en el lumen del retículo endoplásmico rugoso e implica la unión covalente de un residuo de N-acetilglucosamina (GlcNAc) a una asparagina en el sitio consenso Asn-X-Ser/Thr (GlcNAc β 1) de la proteína naciente; la O-glicosilación se inicia en el aparato de Golgi, principalmente, e implica la adición de diferentes monosacáridos, el residuo más frecuentemente adicionado es la N-acetilgalactosamina (GalNAc) al -OH de Ser o Thr en unión α o β (Varki, 2017).

La glicosilación a nivel intracelular es un proceso dinámico que regula los sitios potenciales de fosforilación, mientras que la variabilidad en una estructura

proteica contribuye al plegamiento, especialización y diversidad biológica, así como su direccionamiento y protección ante la proteólisis (Raman y cols., 2005; Alavi y Axford, 2008). Los carbohidratos son las macromoléculas de mayor diversidad y abundancia a nivel biológico, y están implicados en procesos de transferencia de información codificada por el "glicoma". La información codificada por las estructuras de carbohidratos en forma de glicoconjugados, es la modulación dinámica en la superficie celular e intracelular. Los cambios glicosídicos de tipo O y N-glicanos son importantes en la modulación y resolución de procesos inflamatorios (Johnson y cols., 2013). Así mismo, se ha demostrado que los cambios en la glicosilación se asocian a diversos estados patológicos entre los que se encuentran a las enfermedades neurodegenerativas (Dube y Bertozzi, 2005; Alavi y Axford, 2008; Schedin-Weiss y cols., 2014; Kizuka y cols., 2017).

El reconocimiento de los glicoconjugados por lectinas endógenas juega un papel fundamental en la regulación de la inmunidad, ya que son las responsables de decodificar la información presente en los glicanos. Se incluyen a las lectinas de tipo C (MGL, DC-SIGN y Dectin-1), siglecs (lectinas de reconocimiento a ácido siálico) y galectinas (Vasta y cols., 2012). Las galectinas decodifican la información de los glicanos a través de interacciones lectina-carbohidrato, en glicoconjugados (glicoproteínas y glucolípidos) de la superficie celular y de la matriz extracelular (Liu y cols., 2002; Vasta y cols., 2012; Thiemann y Baum, 2016; Gabius y Roth, 2017).

Las galectinas (anteriormente "lectinas de tipo S"), son una familia de lectinas endógenas, que comparten características únicas, como su estructura altamente conservada, su alta especificidad de hidratos de carbono y su capacidad para regular de forma diferencial miles de respuestas biológicas. Las galectinas presentan una afinidad por β -galactósidos. Contienen dominios de reconocimiento a carbohidratos (CRD, por sus siglas en inglés *carbohydrate-recognition domain*) de aproximadamente 135 aminoácidos, organizados en cinco y seis hojas β (Di Lella y cols., 2011; Vasta y cols., 2012), que son responsables del reconocimiento de la estructura mínima de N-acetilactosamina (LacNAc; [Gal β 1-4GlcNAc]_n, donde Gal

es galactosa y GlcNAc es N-acetilglucosamina) (Almkvist y Karlsson, 2002; Hirabayashi y cols., 2002; Liu y cols., 2002; Rabinovich y cols., 2002; Liu, 2005).

La caracterización del complejo Galectina-1-LacNAc muestra residuos de aminoácidos y grupos hidroxilo que participan en las interacciones proteína-carbohidrato, el cual se encuentra constituido por 11 estructuras β -plegadas antiparalelas en forma de sándwich que forman un CRD (Di Lella y cols., 2011; Vasta y cols., 2012) (Figura 11). El sitio de unión a carbohidratos está formado por tres cadenas cóncavas continuas (β 4- β 6) que contienen los residuos de aminoácidos, His44, Asn46, Arg48, His52, Asn61, Trp68, Glu71 y Asn730 que están implicadas en las interacciones directas con la LacNAc (Vasta, 2009; Thiemann y Baum, 2016). Las interacciones adicionales de las moléculas de agua están involucradas en la unión del nitrógeno del grupo de NAc con His52, Asp54 y Arg73, lo que resulta en el incremento de la afinidad por LacNAc sobre Lac.

A diferencia de la galectina-1, la galectina-3 tiene un sitio extendido de unión a carbohidratos formado por una hendidura abierta en ambos extremos, en la que la LacNAc está posicionada de tal manera que el extremo reductor (GlcNAc) está abierto al disolvente, pero la porción Gal no reductora está muy cerca de los residuos en la cadena β 3 (Thiemann y Baum, 2016). El sitio de unión extendido conduce a un incremento en la afinidad por glicanos con múltiples unidades de lactosamina.

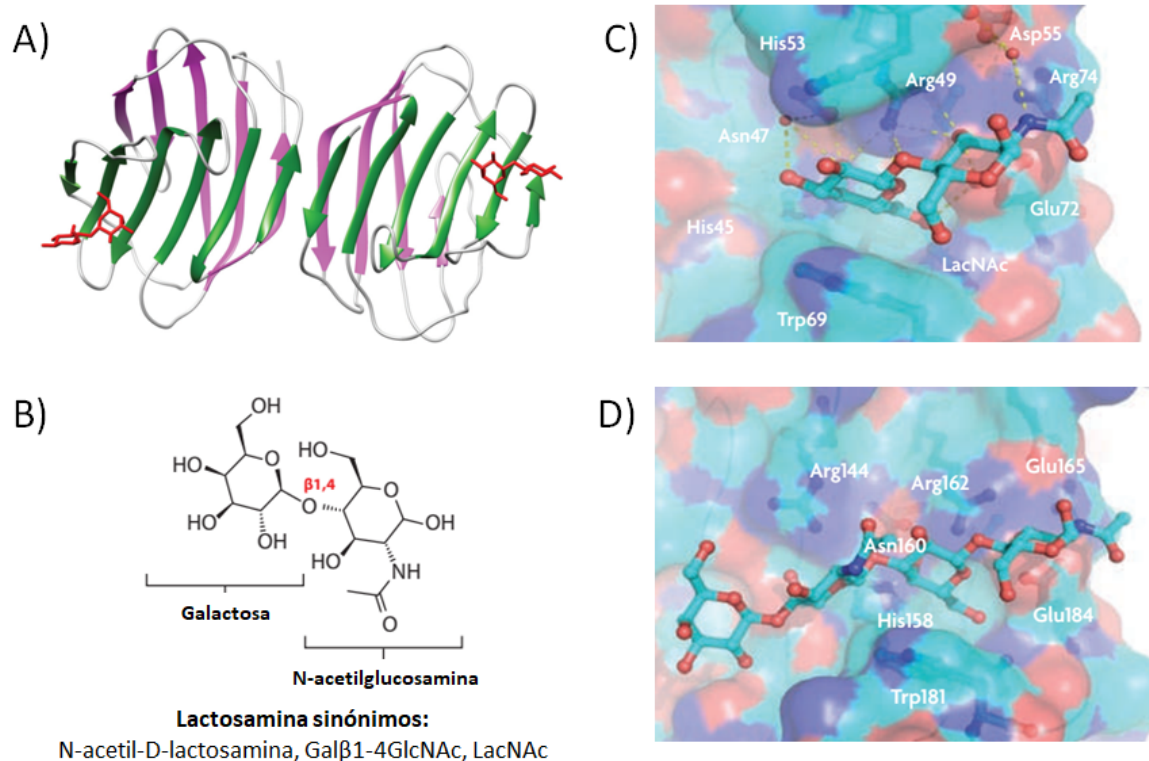


Figura 11. Estructura del CRD de galectina-1. En A) se muestran dos estructuras β -plegadas antiparalelas (rosa y verde) que forman un CDR con actividad lectínica. Se muestra a lactosa (rojo) insertada en cada CDR. En B) se muestra la estructura química de lactosamina, un disacárido que consiste en galactosa y N-acetilglucosamina. En C) se muestra la estructura cristalográfica del complejo Galectina-1-LacNAc de bovino, donde se identifican el plegamiento de Galectina-1, los aminoácidos y los grupos hidroxilo de los carbohidratos que participan en la interacción proteína-carbohidrato. En D) se muestra el sitio extendido del CDR que induce un incremento en la afinidad por múltiples LacNAc (Tomado y modificado de Thiemann y Baum, 2016 y Vasta, 2009).

En la actualidad, se han identificado 15 miembros en mamíferos y se clasifican de acuerdo a su estructura: galectinas “prototipo” que presentan solo un CRD y puede formar homodímeros (galectina-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 y -15); Galectinas de “repetición en tándem” que contienen dos CRD homólogos en una única cadena polipeptídica, separados por un enlazador de hasta 70 aminoácidos, (galectina-4, -6, -8, -9 y -12); galectina “tipo-quimera” (galectina-3) que está formada por un CRD y contiene una región N-terminal no lectínica, rica en prolina y glicina de aproximadamente 120 aminoácidos (Rabinovich y Toscano, 2009; Di Lella y cols., 2011; Rabinovich y Croci, 2012) (Figura 12A).

Las galectinas enriquecen la superficie celular y se acoplan a glicoconjugados de la membrana plasmática y de la matriz extracelular, aunque

también ejerce interacciones homo- y heterotípicas con otras lectinas multivalentes y modulan interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular (Hokama y cols., 2008). Se ha propuesto que regulan el crecimiento, median la adhesión celular, influyen en la apoptosis, participan activamente en la respuesta inmune y participación en la tumorigénesis (Liu y Rabinovich, 2005, 2010).

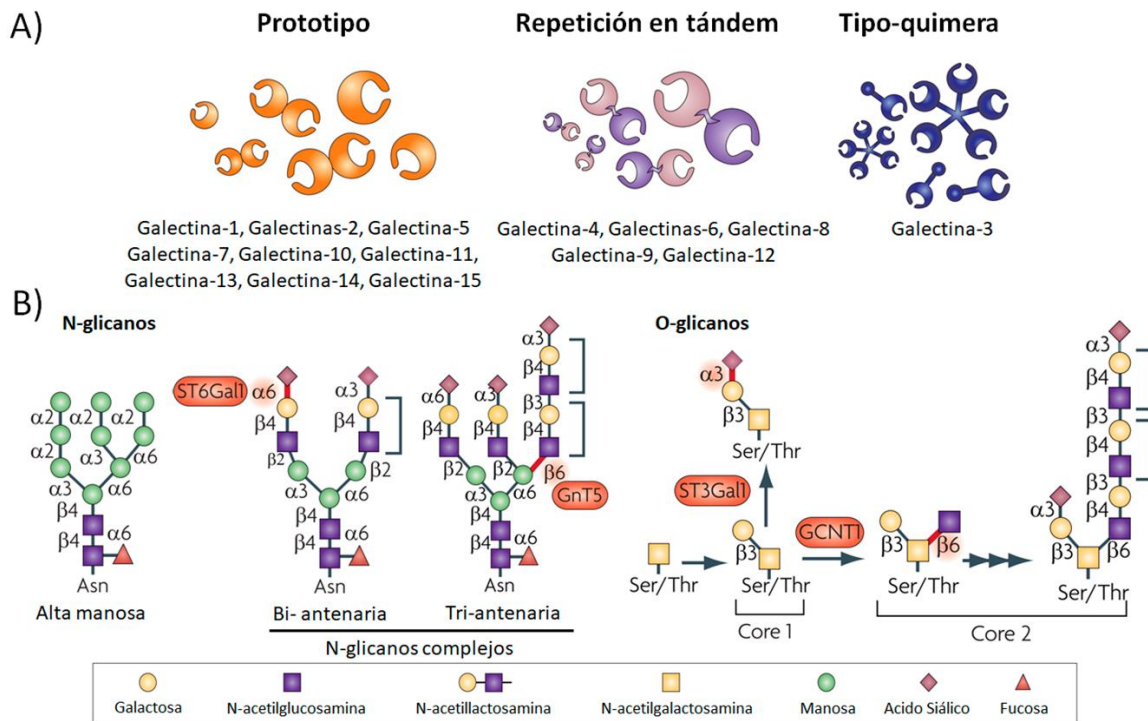


Figura 12. Estructura y clasificación de galectinas e interacciones galectina-glicano. En A) se muestra la representación esquemática de la estructura de diferentes miembros de la familia de las galectinas. Las galectinas pueden subdividirse en tres grupos: prototipo, con un dominio de reconocimiento a carbohidratos (CRD); repetición en tándem, que contiene dos distintos tipos de CRD unidos por una secuencia de 70 aminoácidos; tipo-quimera, que corresponde a Galectina-3, formada por un CRD y una región N-terminal no lectinica, rica en prolina y glicina de aproximadamente 120 aminoácidos. En B) se muestran las diferentes estructuras de glicoconjugados que contienen N- y O-glicanos, e incluye glicosiltransferasas que coordinan la formación de los ligandos glicosídicos para galectinas. En los N-glicanos se presentan estructuras de alta manosa y glicanos complejos y los O-glicanos que se presentan en estructuras complejas (N-acetillactosamina; LacNAc o poli-LacNAc) (Tomado y modificado de Rabinovich y Toscano, 2009).

Las galectinas ejercen actividades biológicas sobre las estructuras N- y O-glicanos a nivel celular (Figura 12B). Dada su localización dentro de los compartimentos citoplásmico y nuclear, se han propuesto múltiples funciones intracelulares para esta familia de proteínas, como la modulación de las vías de

señalización, la regulación del empalme del ARN y el control intracelular de señalización apoptótica, maquinaria endocítica y tráfico celular (Rabinovich y Toscano, 2009). Por su localización extracelular o intracelular contribuyen a la respuesta inmune innata y adaptativa en diferentes enfermedades, mediante el reconocimiento a glicanos (Yang y cols., 2008; Dhirapong y cols., 2009; Thiemann y Baum, 2016; Liu y cols., 2012).

En enfermedades neuronales, las galectinas pueden servir como reguladores de la respuesta inflamatoria y también pueden conferir capacidad de remodelación en tejidos dañados del SNC (Shin, 2013). Estudios realizados por Toscano y cols., en el 2011 demuestran en un modelo *in vitro*, que TNF- α favorece la expresión de Gal-1 para la regulación de la respuesta inmune innata a nivel celular. La citocina TNF- α cumple una importante función como modulador de la respuesta inflamatoria ya que promueve cambios en la expresión de estructuras glicosídicas (Chacko y cols., 2011). Las estructuras glicosídicas favorecen la interacción célula-célula y célula-matriz extracelular, que cambian bajo diferentes condiciones fisiológicas y patológicas para mantener una respuesta inmune adecuada (Varki, 2017).

Se ha considerado a la Galectina-1 (Gal-1) y Galectina-3 (Gal-3) como los principales moduladores de la respuesta inmune (Rabinovich y Croci, 2012). Gal-1 es codificada por el gen *LSGALS1* localizado en el cromosoma 22q12, el transcrito codifica una proteína de 135 aminoácidos (Camby y cols., 2006). Galectina-1 tiene el potencial de regular la respuesta inflamatoria, sin embargo, la información es limitada sobre cómo puede afectar la respuesta inmune de las células en el SNC (Santucci y cols., 2003; Toscano y cols., 2006; Rabinovich y cols., 2007). A nivel periférico Gal-1 promueve la apoptosis selectiva de las células T cooperadoras 1 (Th1) y Th17 (Toscano y cols., 2011), induce la secreción de IL-10, la inhibición del tráfico de células T y el decremento de la capacidad presentadora de antígeno y la producción de óxido nítrico.

En el SNC se ha mostrado que Gal-1 ejerce un efecto positivo en la desactivación de la microglia y promueve un fenotipo de activación alternativa a través de la modulación de p38MAPK, CREB, y NF- κ B (Starossom y cols., 2012).

La Gal-1 es expresada en las células progenitoras neuronales en la ZSG del GD y en la ZSV de los ventrículos, ambas regiones con la capacidad de neurogénesis. La Gal-1 en su forma reducida ejerce un efecto positivo sobre las CPN además favorece la diferenciación e interacción célula-célula (Sakaguchi y cols., 2006; Imaizumi y cols., 2011).

La expresión de Gal-3 se ha propuesto como un potente regulador de la respuesta inmune (Liu y cols., 2002). Se ha demostrado que Gal-3 favorece la activación de varias células de la respuesta inmune, además de participar activamente en el proceso de inflamación (Walther y cols., 2000; Kim y cols., 2003; Almkvist y Karlsson, 2002; Yan y cols., 2009). La expresión de Gal-3 confiere a las células de la respuesta inmune la capacidad de regular la migración por adhesión con la matriz extracelular y regular la sobrevivencia dependiendo de la localización intracelular o extracelular (Elola y cols., 2005; Yang y cols., 2012; Wan y Liu, 2016). Se ha implicado en la regulación de la respuesta de neuroinflamación. Gal-3 es producida por macrófagos y células de la microglia activados (Walther y cols., 2000; Yan y cols., 2009).

La expresión de Gal-3 es constitutiva en la ZSV, mantiene la citoarquitectura del nicho neurogénico y modula la migración de los neuroblastos a lo largo de la vía rostral medial del bulbo olfatorio (Kim y cols., 2003; Comte y cols., 2011). La Gal-3 ha sido localizada predominantemente en células positivas a Iba1 (marcador específico de la microglia), sugiriendo que ejerce su efecto mediante la modulación de la respuesta inflamatoria en modelos de daño cerebral (Huong y cols., 2011). Tiene un importante rol en la proliferación celular y regulación de la apoptosis, así como en procesos patológicos participa como un mediador de la respuesta inflamatoria, asociada a la activación de la microglia. Un reciente estudio sugiere que Gal-3 incrementa la respuesta inflamatoria a través de la microglia y astrocitos (Jeon y cols., 2010).

2. Justificación

Se ha demostrado que la administración del péptido A β ₂₅₋₃₅ en hipocampo y corteza temporal genera daño en el aprendizaje y la memoria, y ha permitido asociar estos cambios con las etapas tempranas de la EA (Limón y cols., 2009, 2011; Díaz y cols., 2012). Su mecanismo de daño se caracteriza por la inducción de neurotoxicidad, daño mitocondrial, estrés oxidativo, daño sináptico, inflamación y finalmente la muerte neuronal (Limón y cols., 2009; Carrillo-Mora y cols., 2014; Limón y cols., 2011; Zussy y cols., 2011; Zussy y cols., 2013). Todos estos eventos conllevan a la pérdida de la capacidad de aprendizaje y la formación de nuevas memorias.

Se ha propuesto a la inflamación como uno de los principales mecanismos de daño inducido por el péptido A β ₂₅₋₃₅ (Díaz y cols., 2012; Zussy y cols., 2011; Zussy y cols., 2013). El proceso de inflamación se caracteriza por la activación de las células gliales (microglia y astrocitos) (Sofroniew y Vinters, 2010; Heneka y cols., 2014). Las células de la glía coordinan los mecanismos de inflamación a través del incremento de citocinas pro y antiinflamatorias, quimiocinas, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Whitney y cols., 2009; Lee y cols., 2010; Heneka y cols., 2015). Se ha demostrado que las galectinas (lectinas que reconocen N-acetil-lactosamina [Gal β (1-4)-GlcNAc; LacNAc]) ejercen un efecto sobre la modulación de la respuesta inmune (van Kooyk y Rabinovich, 2008; Rabinovich y cols., 2012).

En el sistema nervioso se ha demostrado que Gal-1 y Gal-3 participan en la regulación de la actividad de los astrocitos y la microglia. Gal-1 actúa como regulador negativo de la inflamación, ya que promueve la apoptosis, induce la expresión de IL-10 y regula a la baja las citocinas proinflamatorias (Imaizumi y cols., 2011; Starossom y cols., 2012). Por otra parte, la expresión de Gal-3 modula la respuesta inmune adaptativa e induce la activación de microglia y astrocitos (Walther y cols., 2000; Yan y cols., 2009). Sin embargo, aún no es conocido si la neuroinflamación inducida por el péptido A β ₂₅₋₃₅ modifica la expresión de Gal-1 y Gal-3, y su relación con el daño sobre los sustratos necesarios en la formación de la memoria.

La inflamación se ha identificado como uno de los factores clave en la disminución de la neurogénesis en el giro dentado (GD). La actividad exacerbada de los astrocitos y la microglía favorece un microambiente neurotóxico que disminuye la proliferación y la diferenciación neuronal (Ekdahl y cols., 2003; Monje y cols., 2003). La neurogénesis es necesaria para el aprendizaje y la memoria, puesto que al integrarse nuevas neuronas permiten una mejor organización, separación e integración de la información adquirida (Bruel-Jungerman y cols., 2006; Deng y cols., 2009; Deng y cols., 2010; Lemaire y cols., 2012). Lo que nos lleva a proponer a la neuroinflamación inducida por el péptido A β ₂₅₋₃₅ como el principal mecanismo de daño sobre el aprendizaje y la memoria, asociado a una posible disminución de la neurogénesis.

Debido a ello es necesario comprender los mecanismos implicados en la modulación de la inflamación. En el presente trabajo proponemos estudiar a las galectinas como moduladores importantes en la respuesta de neuroinflamación. El comprender su participación y la relación de estas con la neuroinflamación permitirá proponerlas como un blanco terapéutico en las enfermedades neurodegenerativas.

3. Hipótesis

La neuroinflamación inducida por la administración del péptido $A\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo promueve un incremento en la expresión de galectinas y un déficit del proceso de neurogénesis y la memoria espacial.

4. Objetivo general

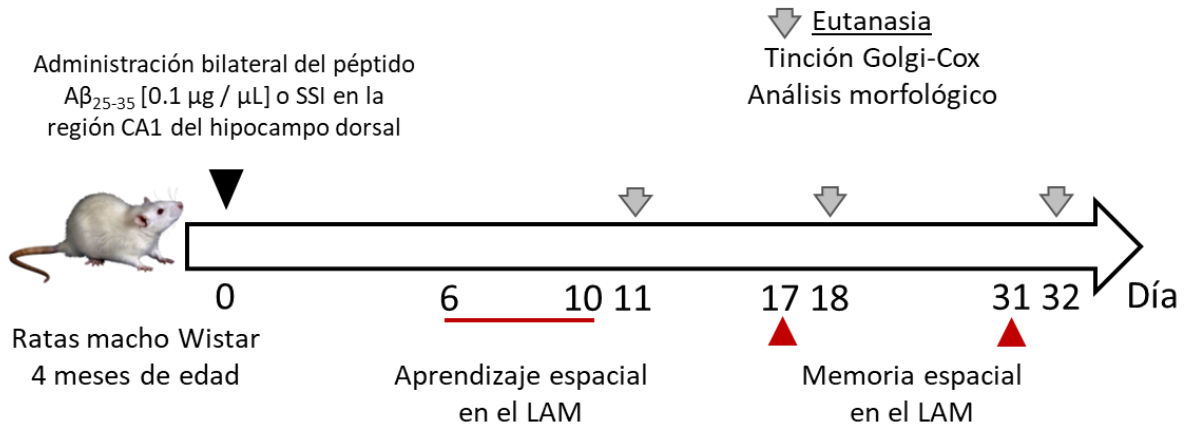
Evaluar el efecto de la neuroinflamación inducida por la administración del péptido $A\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo sobre la expresión de galectinas y su relación con los cambios en el proceso de neurogénesis y la memoria espacial.

4.1 Objetivos particulares

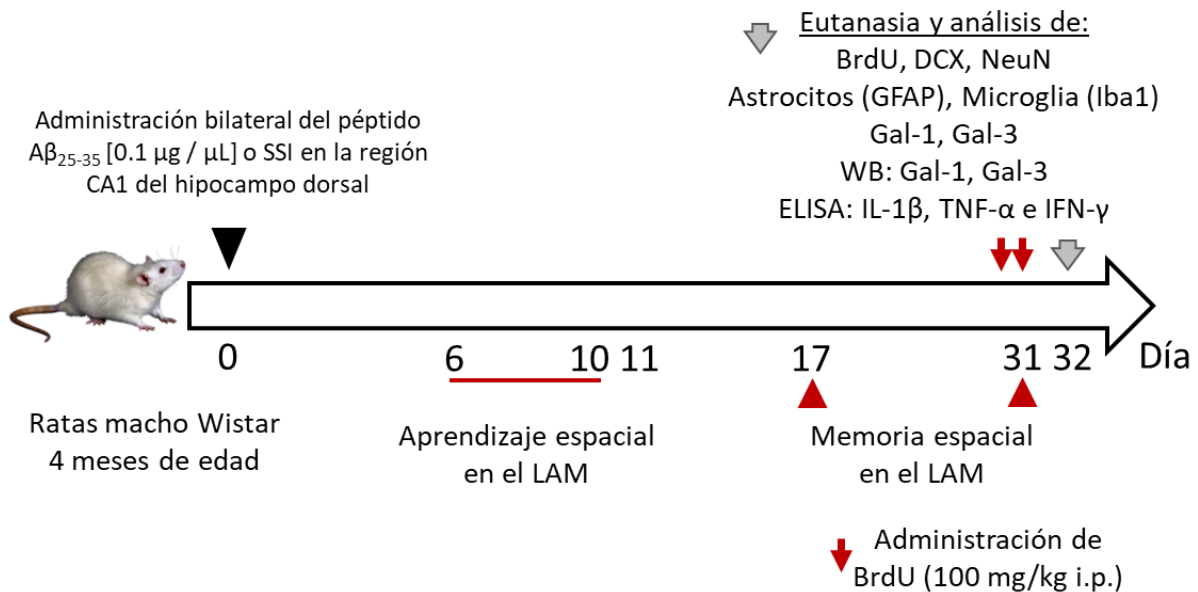
1. Estudiar el efecto de la administración del péptido $A\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo sobre el aprendizaje y la memoria espacial a largo plazo en el laberinto acuático de Morris.
2. Estudiar el efecto de la administración del péptido $A\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo sobre la morfología dendrítica en el giro dentado.
3. Estudiar el efecto de la administración del péptido $A\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo sobre el proceso de neurogénesis en el giro dentado.
4. Estudiar el efecto de la administración del péptido $A\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo sobre la expresión de Galectina-1 y Galectina-3 en el hipocampo y giro dentado.
5. Estudiar el efecto de la administración del péptido $A\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo sobre la activación de la microglia y los astrocitos en el hipocampo y el giro dentado.
6. Estudiar el efecto de la administración del péptido $A\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo sobre la expresión de las citocinas IL-1 β , TNF- α e INF- γ en la formación del hipocampo.

5. Diagrama de trabajo

Diseño experimental 1



Diseño experimental 2



6. Materiales y métodos

6.1 Animales de experimentación

En el presente proyecto se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (n=108), provenientes del Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Los animales de experimentación tuvieron una edad de 4 meses, con un peso entre 300-350 g. Los animales fueron resguardados en el vivario del Laboratorio de Neurofarmacología. Durante su estancia se mantuvieron en grupos de 5 animales por caja de acrílico, con libre acceso a agua y alimento. Las condiciones ambientales del vivario se mantuvieron constantes, a una temperatura de 22 ± 1 °C y ciclos luz-oscuridad de 12h/12h.

Todos los procedimientos descritos en el presente estudio fueron establecidos de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999): Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales del laboratorio; del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales del Laboratorio (CICUAL-BUAP) e Internacional Guide for the care and use of laboratory animals (The National Academies Press, 2011) 8th edition. El sustentante cursó y aprobó el taller de manejo de animales del laboratorio impartido por el bioterio Claude Bernard de la BUAP en el año 2014.

6.2 Preparación del péptido A β ₂₅₋₃₅

El fragmento 25-35 del péptido amiloide- β (A β ₂₅₋₃₅, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO EE. UU.) fue disuelto en solución salina isotónica (SSI, cloruro de sodio al 0.9%), para obtener una concentración final de 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. El péptido A β ₂₅₋₃₅ se incubó a 37 °C durante 36 horas para favorecer su agregación (Maurice y cols., 1998; Stepanichev y cols., 2008; Ortega y cols., 2014). Se realizó el mismo tratamiento a la SSI, que se empleó como control. La administración del péptido A β ₂₅₋₃₅ y SSI en la región CA1 del hipocampo se realizó mediante cirugía estereotáxica.

6.3 Administración del péptido $A\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo por cirugía estereotáxica

Previo a la administración del péptido $A\beta_{25-35}$, se estableció el sitio de depósito en la región CA1 del hipocampo. Los animales fueron anestesiados con ketamina-xilazina (en una relación de 75:10 mg/Kg) por vía i.p. Una vez que los animales alcanzaron la anestesia profunda se colocaron en el aparato de cirugía estereotáxica para roedores (Stereotaxic Instruments, Stolting Co.). La localización del sitio de depósito se determinó mediante la microinyección bilateral de azul de metileno (0.01%) en la región CA1 del hipocampo. Se realizó la extracción del cerebro de rata, la fijación y la obtención de cortes coronales a 100 μm espesor para su verificación. Las coordenadas propuestas para la administración fueron determinadas mediante el atlas de Paxinos y Watson, 1998: anteroposterior (AP): -4.0 mm, mediolateral (LM): ± 2.9 mm y dorsoventral (DV): -2.4 mm, respecto a Bregma (Figura 13).

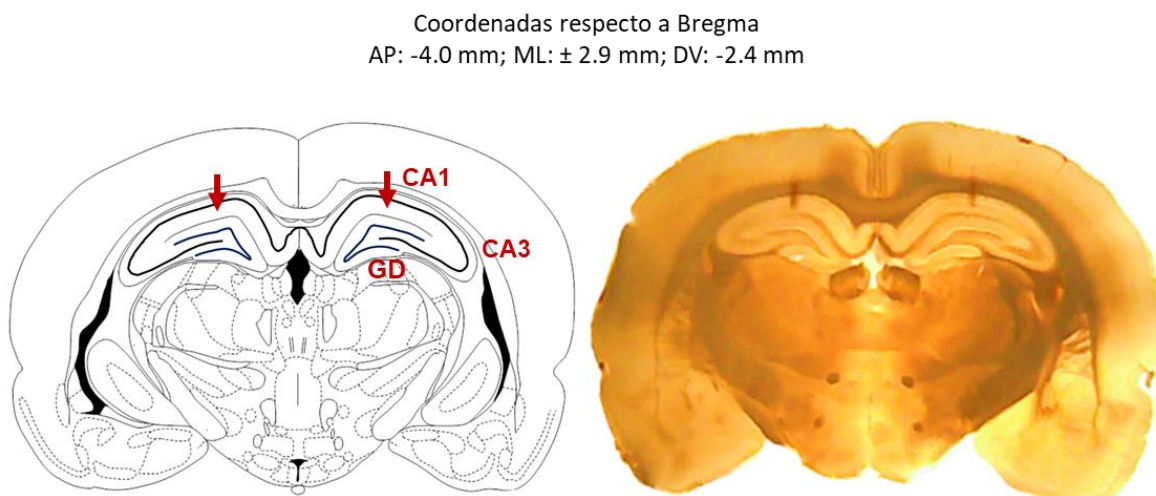


Figura 13. Coordenadas de la región CA1 del hipocampo. A) regiones de la formación hipocampal de interés en el presente estudio. B) Corte coronal en el que se observa la formación del hipocampo y la localización del sitio de lesión que se realizó mediante la microinyección bilateral de azul de metileno en la región CA1 del hipocampo de rata.

Una vez determinado el sitio de lesión, los animales fueron sometidos a cirugía estereotáxica con el fin de administrar en la región CA1 del hipocampo las siguientes sustancias: SSI (grupo control) y el péptido $A\beta_{25-35}$ (grupo problema). Posterior a la cirugía, los animales fueron suturados con hilo de seda 3-0, y se les

administró enrofloxacin al 10 % por vía intramuscular (i.m.) por tres días, con cuidados posoperatorios para prevenir posteriores infecciones. Los animales fueron llevados al vivario y separados en cajas de acrílico para su recuperación posterior a la cirugía.

6.4 Administración de BrdU

El análogo de la timidina, BrdU (5-bromo-2'-desoxiuridina, Sigma-Aldrich Co. LLC), fue disuelto en una solución de NaCl al 0.9 %. Los animales recibieron dos administraciones de BrdU a una dosis de 100 mg/Kg, por vía i.p., con un intervalo de tiempo de 12 h entre la primera y segunda administración, para posteriormente ser sometido al protocolo conductual. El BrdU se incorpora a las células durante la fase S del ciclo celular, lo que permite evaluar el marcaje de las células que se dividen activamente en el GD ante un daño generado por el péptido A β ₂₅₋₃₅.

6.5 Evaluación del aprendizaje y memoria en el laberinto acuático de Morris

Las pruebas conductuales se realizaron de acuerdo con lo propuesto por Richard Morris en 1984 (Morris, 1984). El modelo consiste en una tina circular (160 cm de diámetro x 60 cm de altura) que fue llenada hasta la mitad de su capacidad con agua a temperatura constante (Figura 14A). La tina se dividió imaginariamente en cuatro cuadrantes y la plataforma de escape (30 cm de alto x 12 cm de ancho) se colocó en la posición sureste, equidistante al borde y al centro de la tina (Figura 14B). La plataforma de escape permaneció 2 cm bajo el nivel del agua para que no fuera visible. Señales intra- y extra-laberínticas fueron colocadas para que los animales las consideren como referencia espacial.

Durante las pruebas conductuales, el agua empleada para llenar el laberinto acuático de Morris se mantuvo a una temperatura constante de 22 ± 2 °C y se tiñó de color blanco con dióxido de titanio (0.1 %). En la habitación donde se encontraba el laberinto fueron colocadas señales extra e intra laberínticas. Los animales fueron llevados a la habitación donde se encuentra el laberinto acuático de Morris 30 min antes de la prueba conductual, con la finalidad de disminuir el estrés generado. Las pruebas de aprendizaje y memoria se videograbaron para su posterior análisis.

El protocolo de aprendizaje y memoria se realizó con base en lo propuesto por Limón y cols., 2009. La prueba de aprendizaje se desarrolló del día 6 al 10, después de la administración del péptido A β ₂₅₋₃₅ en la región CA1 del hipocampo. El laberinto fue dividido imaginariamente en cuatro cuadrantes respecto a los puntos cardinales (Figura 14C). El protocolo de aprendizaje consistió en la localización de una plataforma de escape en el centro del cuadrante sureste. La plataforma permaneció oculta a 1 cm por debajo del nivel del agua. Se realizaron 4 ensayos por día de aprendizaje, con un intervalo de 50 minutos entre cada ensayo. En cada ensayo los animales fueron liberados desde los puntos de partida N, O, S y E, en orientación a la pared del laberinto. Se permitió un tiempo máximo de 90 s para encontrar la plataforma de escape. En caso de no lograr su localización, los animales fueron llevados a la plataforma de escape permitiéndoles permanecer durante 30 s. Se evaluó la latencia al escape, el tiempo de permanencia en el cuadrante blanco, el número de cruces por la zona blanco y las trayectorias de navegación.

La prueba de memoria se aplicó los días 17 y 31 después de la administración del péptido A β ₂₅₋₃₅ en la región CA1 del hipocampo. La plataforma de escape fue retirada del laberinto acuático de Morris. La prueba de memoria consto de dos ensayos por día de evaluación, los animales fueron colocados en los puntos de partida (N y O) que corresponden a los más alejados del cuadrante donde se localizó la plataforma de escape (sureste). Los animales tuvieron un tiempo máximo de 90 s para realizar una trayectoria libre en la búsqueda de la plataforma de escape. Se registró la latencia al primer cruce, el tiempo de permanencia, el número de visitas al cuadrante blanco y la trayectoria de navegación.

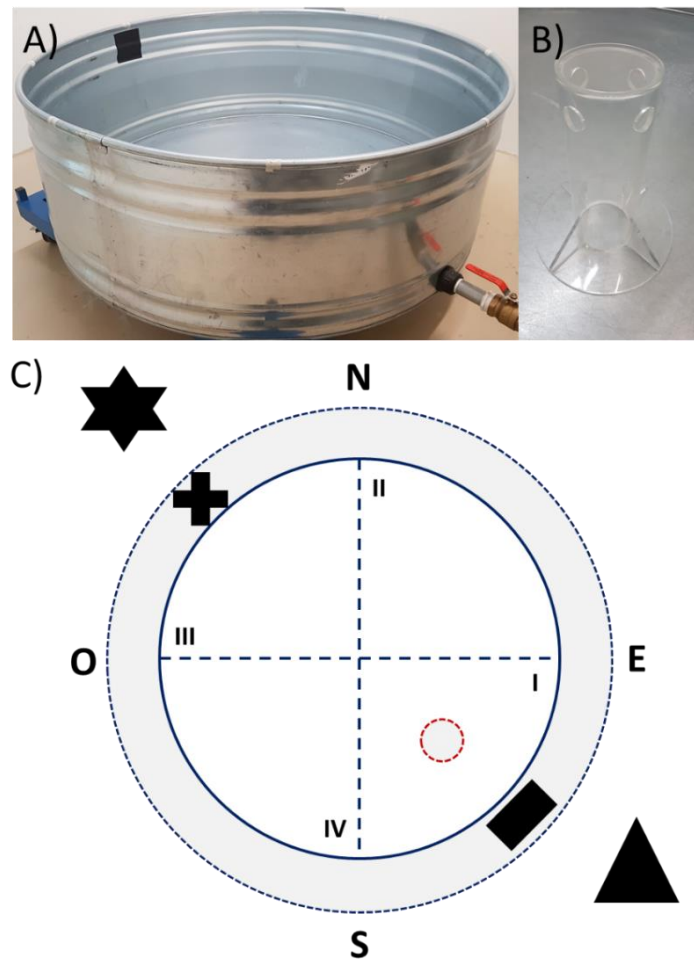


Figura 14. Laberinto acuático de Morris. En A) se muestra el laberinto acuático de Morris Stoelting Co. del Laboratorio de Neurofarmacología. En B) se muestra la plataforma de escape. En C) se muestra la distribución de los cuadrantes, así como la localización de la plataforma de escape y las señales intra y extra laberínticas. Laberinto acuático de Morris del Laboratorio de Neurofarmacología.

6.6 Evaluación de las dendritas y las espinas dendríticas por la tinción de Golgi-Cox

La obtención del tejido cerebral para evaluar la morfología neuronal se realizó posterior a la prueba conductual, seis animales de cada grupo fueron seleccionados al azar. Los animales fueron sometidos a eutanasia por una sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg/Kg) por vía i.p. Posteriormente se realizó una perfusión intracardial con 200 mL de SSI (0.9 % de NaCl) aproximadamente. Los cerebros fueron removidos y almacenados por 14 días en solución Golgi-Cox con un cambio de la solución vieja por solución fresca a los 7 días, posteriormente fueron colocados en una solución de sacarosa al 30 % por 14 días con un cambio de

solución a los 7 días. Se realizaron cortes coronales de 200 μm a nivel del hipocampo dorsal (-2.5 a -4.5 mm respecto a Bregma) en un vibratomo (Leica, modelo VT1000S). Las secciones fueron colectadas en laminillas gelatinizadas al 2 %. El proceso de revelado se realizó en un cuarto oscuro, se inició con un lavado de agua destilada durante un minuto, posteriormente las laminillas fueron sumergidas en hidróxido de amonio al 30 % (revelador) por 30 min. Los tejidos fueron lavados con agua destilada durante 1 min, después se colocaron por 30 min en fijador Kodak para película fotográfica diluido 1:1 en agua destilada. Se realizaron nuevamente lavados con agua destilada durante 1 min. Se deshidrataron con soluciones de alcohol de concentraciones crecientes: 70 %, 80 %, 95 % por 5 min cada uno y finalmente 10 min en alcohol al 100 %. Por último, se aclararon en xilol por 15 min y se procedió al montaje de cubreobjetos con resina sintética. Las laminillas se dejaron de 3 a 4 días en la oscuridad para posteriormente realizar el análisis microscópico.

6.7 Análisis microscópico y método de Sholl

El análisis morfológico de las neuronas granulares del giro dentado nos permite conocer la distribución dendrítica, longitud dendrítica y el número de espinas, así como, los cambios morfológicos asociados al efecto neurotóxico del péptido $\text{A}\beta_{25-35}$. Se identificó el área de interés con la ayuda del atlas de Paxinos y Watson, 1998. Una vez localizada el área de interés en el microscopio óptico (Leica modelo DMSL) acoplado a una cámara lúcida, se realizó la observación a 40X para el trazado de las neuronas del giro dentado y así poder obtener manualmente la reproducción bidimensional de 10 neuronas por cerebro (cinco neuronas por hemisferio) de cada sujeto experimental. Los criterios para considerar a una neurona dentro del análisis fueron de acuerdo a lo propuesto por Pawluski y cols., 2012: 1) la neurona debe ubicarse en la zona de interés de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson, 1998, y aislada de otras neuronas para poder visualizarla completa; 2) el tipo de neurona se elige por su forma física característica; 3) la neurona a elegir no debe tener dendritas quebradas o incompletas; 4) se debe dibujar el soma de la neurona y las dendritas observadas al microscopio óptico, para obtener una reproducción bidimensional y poder realizar el análisis de Sholl.

Para llevar a cabo el análisis de Sholl se identificaron las dendritas de cada orden dendrítico de las neuronas mediante el uso de lapices de colores diferentes, remarcando cada dendrita por orden de ramificación con un color diferente: las dendritas de primer orden (color 1) son las que derivan del soma neuronal, la siguiente bifurcación da origen a dendritas de segundo orden (color 2) y la segunda bifurcación da origen a dendritas de tercer orden (color 3), etc. Posteriormente se colocó una plantilla transparente de círculos concéntricos, el círculo del centro debe coincidir con el soma. La distancia entre cada círculo corresponde a una longitud de 10 μm , lo que permitió evaluar el número de intersecciones dendríticas por círculo concéntrico (Figura 15). El análisis de Sholl antes descrito, permite calcular los siguientes parámetros: la longitud por orden dendrítico, que nos permite saber si la neurona proyectó o contrajo un conjunto de dendritas del mismo orden; la longitud dendrítica total es la sumatoria de la longitud de todas las dendritas que componen a la neurona.

El estudio de la densidad de las espinas dendríticas se realizó en la porción final de las dendritas más distales respecto al soma, en las neuronas previamente analizadas, que corresponde a la dendrita de mayor orden. Para la cuantificación del número de espinas dendríticas se evaluaron tres segmentos continuos de 10 μm , y posteriormente se obtuvo el promedio del número de espinas en cada neurona. La observación y cuantificación de las espinas dendríticas se realizó mediante el empleo de un microscopio óptico Leica (DM1000) a 100X y la obtención de imágenes fue realizada con una cámara de análisis Jenoptik Optical System con el software ProgRes series.

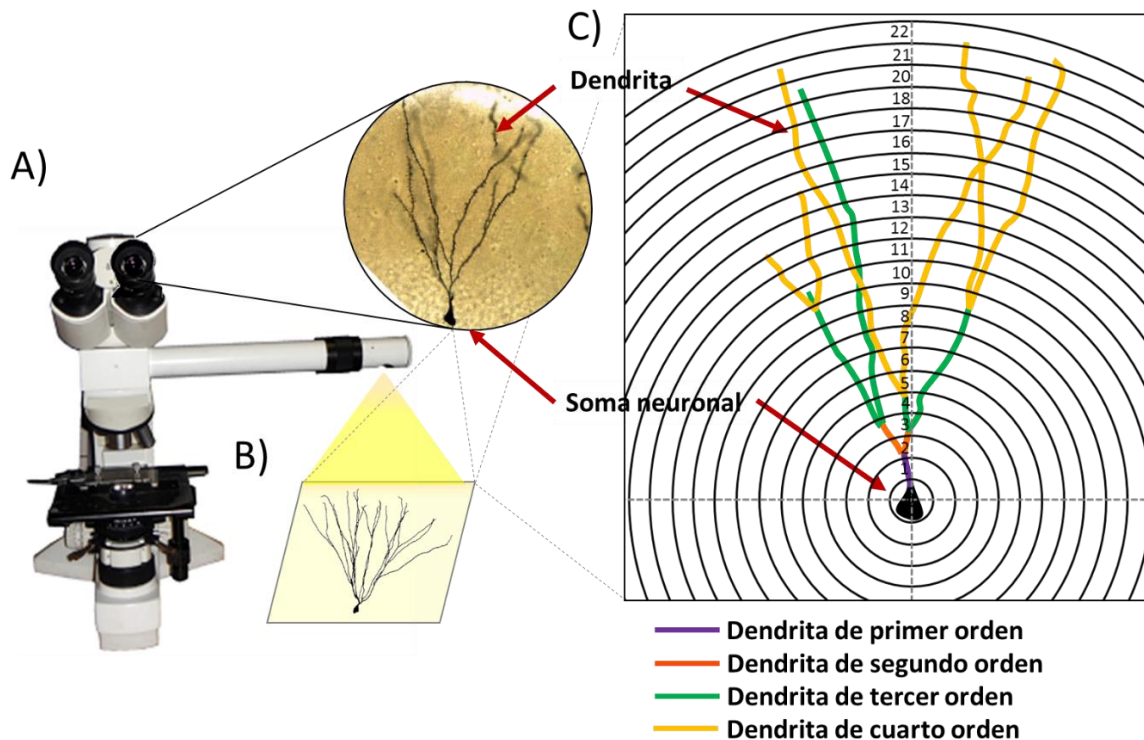


Figura 15. Análisis de Sholl para la evaluación de una neurona. En A) se muestra la identificación de una neurona granular del GD, ubicada en la zona de interés, de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson, 1998, mediante el empleo de un microscopio óptico de campo claro. En B) se muestra la representación bidimensional (dibujo) de una neurona granular del GD, se debe dibujar tanto el soma de la neurona como las dendritas encontradas en el primer y segundo plano de la imagen observada al microscopio óptico. En C) se muestra la representación bidimensional para proceder a realizar el análisis de Sholl, que consistió en identificar el orden dendrítico de cada neurona representada bidimensionalmente. Se emplearon colores diferentes para identificar las dendritas de primer orden, segundo orden, tercer orden, hasta n orden. Posteriormente se colocó una plantilla transparente que cuenta con una serie de círculos concéntricos, el círculo del centro debe coincidir con el soma, la distancia entre cada círculo corresponde a 10 μm , lo que permite evaluar el número de intersecciones y la distribución dendrítica de la neurona.

6.8 Preparación de los tejidos cerebrales para la técnica de inmunofluorescencia

Terminadas las pruebas conductuales se realizó la preparación del tejido cerebral para las pruebas inmunohistoquímicas de acuerdo con el protocolo propuesto por Limón y cols., 2009. Los animales fueron sometidos a eutanasia mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg/Kg) por vía i.p. Se realizó la perfusión intracardiaca con SSI (100 mL) y paraformaldehído al 4 % en buffer de fosfatos (PBS) pH=7.4, 0.1 M (100 mL). El tejido cerebral obtenido de cada grupo fue colocado en paraformaldehído al 4 % en PBS pH 7.4, 0.1M por 48 h.

Posteriormente, los tejidos fueron cortados en un vibratomo (VT1000 Leica Germany) de forma coronal a un grosor de 40 μm y se mantuvieron en placas de flotación con una solución de sacarosa al 10% (Merck México).

6.9 Evaluación de la expresión de NeuN por inmunofluorescencia

El tejido cerebral fue lavado con PBS pH 7.4, 0.1 M y Tritón X-100 al 0.2 % (PBS-T) por 10 min, tres veces consecutivas. Posteriormente, se incubó a temperatura ambiente en una solución de BSA libre de IgG al 2 % en PBS-T, durante una hora. Posteriormente, las muestras se lavaron con PBS en tres periodos de 10 minutos cada uno y después se incubaron con el anticuerpo primario anti-NeuN (abcam, dilución 1:250) durante una noche a una temperatura de 4 °C. Concluido el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, los tejidos se lavaron con PBS, en tres periodos de 10 minutos cada uno. Después del lavado, para la inmunodetección indirecta, los tejidos se incubaron con el anticuerpo secundario bioespecifico conjugado con Lisamina-Rhodamine (Jackson Immuno Research, dilución 1:100) durante dos horas a temperatura ambiente. Terminado el periodo de incubación, las muestras se lavaron con PBS en tres periodos de 10 minutos cada uno y montaron con Mowiol + DABCO como un protector de fluorescencia y se cubrieron con cubreobjetos y se sellaron con esmalte.

Se realizó la evaluación del número de células inmunorreactivas a NeuN en la formación del hipocampo dorsal de aproximadamente -2.5 a -4.5 respecto a Bregma. Se tomaron fotomicrográficas de las regiones a analizar con una magnificación de 400X, con un microscopio Leica DM1000 acoplado a una cámara de captura Jenoptik Optical System con el software ProgRes series. La cuantificación de células inmunorreactivas se realizó utilizando el sistema de análisis de imágenes por ImageJ (National Institutes of Health, USA), para identificar las células inmunorreactivas por tejido del hipocampo dorsal. Las evaluaciones se realizaron en 5 animales por grupo experimental, de los cuales se contemplaron para el análisis de 5 a 6 secciones del hipocampo dorsal por animal. Se realizó la evaluación de tres áreas de cada hemisferio por tejido y se obtuvo el promedio del número de células positivas por área (0.112 mm^2).

6.10 Evaluación de la marca de BrdU y la expresión de DCX por inmunohistoquímica

En la evaluación del proceso de neurogénesis, los animales fueron administrados con BrdU a una dosis de 100 mg/Kg por vía i.p., el día 31 posterior a la administración de A β ₂₅₋₃₅. La evaluación de la marca a BrdU y la expresión de DCX se realizó por ensayos inmunohistoquímicos, mediante el kit de LSAB/HRP. El tejido cerebral fue lavado con Tritón X-100 al 0.2 % en PBS pH 7.4, 0.1 M (PBS-T) por 10 min, tres veces consecutivas en agitación constante (agitador LABNET ROCKET 25). Las muestras seleccionadas para la determinación de BrdU fueron sometidas a incubación en una solución de ácido clorhídrico (1 N) por 30 min a temperatura ambiente con el fin de desnaturalizar el ADN. Posteriormente, las muestras se sometieron a una incubación con ácido clorhídrico (2 N) por 30 min a 45 °C. Inmediatamente después del tratamiento el tejido se lavó con buffer de boratos (0.1 M) por 10 min a temperatura ambiente (Snyder y cols., 2005). Posteriormente, fue procesado tomando como referencia los protocolos reportados por Granado y cols., 2008. El tejido se incubó en PBS-T por 10 min, tres veces consecutivas durante 30 minutos en H₂O₂ al 3 % y metanol al 10 % en PBS-T. Terminado el tiempo de incubación, el tejido fue lavado con PBS-T, como se describe anteriormente. Para bloquear los sitios inespecíficos en el tejido, se incubó en una solución de albúmina sérica de bovino (BSA) libre de IgG al 2 % en PBS-T durante una hora y media. Paso seguido, las muestras se lavaron con PBS, en tres periodos de 10 minutos cada uno y después se incubaron con el anticuerpo primario anti-DCX (Santa Cruz, dilución 1:100) o anti-BrdU (abcam, dilución 1:250) durante una noche a una temperatura de 4 °C. Posteriormente, el tejido fue lavado con PBS tres veces por un periodo de 10 minutos cada vez e incubados con biotina (Dako) durante dos horas en agitación constante. Transcurrido el tiempo, se realizaron tres lavados con PBS-T y se incubaron con estreptavidina-HRP durante dos horas en agitación constante. A continuación, el tejido se lavó tres veces con PBS por periodos de 10 minutos cada uno y fue montado en portaobjetos gelatinizados al 2 %. Posteriormente, las preparaciones fueron expuestas al cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) [50 mg / 100 mL], se agregaron 50 μ L del cromógeno sobre

cada tejido y se dejó reaccionar durante 10 minutos hasta que la inmunorreactividad se evidenciara con una coloración café. Las preparaciones se lavaron con PBS y se deshidrataron con etanol al 70 %, 96 %, 100 % y xilol para ser montadas con un cubreobjetos utilizando resina hidrofóbica Poly-mount (PolyScience, EUA).

Se realizó la evaluación de la marca a BrdU y la expresión a DCX en la región del DG que corresponde a la formación del hipocampo dorsal de -2.5 a -4.5 respecto a Bregma. Se tomaron fotomicrografías de las regiones analizadas a una amplificación de 400X, con un microscopio Leica DM1000 acoplado a una cámara de captura Jenoptik Optical System con el software ProgRes series. La cuantificación de células inmunorreactivas se realizó utilizando el sistema de análisis de imágenes por ImageJ (National Institutes of Health, USA), para identificar células inmunorreactivas por tejido en el hipocampo dorsal. Se consideró una marca positiva a BrdU a las células que presentaron inmunorreactividad en forma circular u ovoide, ya que la integración de BrdU es a nivel del ADN contenido en el núcleo celular. La inmunoreactividad positiva a DCX fue identificada en las células que presentaron un cuerpo celular (soma) y proyecciones dendríticas. Las evaluaciones se realizaron en 5 animales por grupo experimental, de los cuales se contemplaron para el análisis de 5 a 6 secciones del hipocampo dorsal por animal. Se realizó la evaluación de tres áreas de cada hemisferio por tejido y se obtuvo el promedio del número de células positivas por área (0.112 mm²).

6.11 Evaluación de astrocitos, microglia y galectinas por inmunohistoquímica de fluorescencia

El tejido cerebral fue lavado con PBS pH 7.4, 0.1 M y Tritón X-100 al 0.2 % (PBS-T) por 10 min, tres veces consecutivas. Posteriormente, se incubó a temperatura ambiente en una solución de BSA libre de IgG al 2 % en PBS-T, durante una hora. Posteriormente, las muestras se lavaron con PBS en tres periodos de 10 minutos cada uno y después se incubaron con el anticuerpo primario anti-GFAP (Dako, dilución 1:250) o anti-Iba1 (Wako, dilución 1:250) durante una noche a una temperatura de 4 °C. Concluido el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, los tejidos se lavaron con PBS, en tres periodos de 10 minutos cada uno. Después

del lavado, para la inmunodetección indirecta, los tejidos se incubaron con el anticuerpo secundario bioespecifico conjugado con Lisamina-Rhodamine (Jackson Immuno Research, dilución 1:100) durante dos horas a temperatura ambiente. Terminado el periodo de incubación, las muestras se lavaron con PBS en tres periodos de 10 minutos cada uno. Los tejidos se incubaron a temperatura ambiente en una solución de BSA libre de IgG al 2% en PBS durante una hora. Para la segunda marca el tejido fue incubado con el anticuerpo primario anti-Gal-1 o anti-Gal-3 (Santa Cruz Biotechnology, dilución 1:100) durante dos horas a 37 °C. Terminado el periodo de incubación, el tejido se lavó tres veces con PBS en tres periodos de 10 minutos cada uno. Después del lavado, para la inmunodetección indirecta, el tejido se incubó con el anticuerpo secundario bioespecifico conjugado con fluoresceína 5-isocianato (FITC) (Jackson Immuno Research, dilución 1:100) durante dos horas a temperatura ambiente. Terminado el periodo de incubación, las muestras se lavaron tres veces con PBS en tres periodos de 10 minutos cada uno. Finalmente, las preparaciones se incubaron con 4', 6-diamino-2-fenilindol (DAPI) durante un periodo de 20 minutos, se lavaron y montaron con Mowiol + DABCO como un protector de fluorescencia, se cubrieron con cubreobjetos y se sellaron con esmalte.

Se realizó la evaluación de las células inmunorreactivas a GFAP, Iba1, Gal-1 y Gal-3 y la colocalización en la formación del hipocampo dorsal de aproximadamente -2.5 a -4.5 respecto a bregma. Se tomaron fotomicrografías de las regiones a analizar con una magnificación de 400X, con un microscopio Leica DM1000 acoplado a una cámara de captura Jenoptik Optical System con el software ProgRes series. La cuantificación de células inmunorreactivas se realizó utilizando el sistema de análisis de imágenes por ImageJ (National Institutes of Health, USA), para identificar células inmunorreactivas por tejido del hipocampo dorsal. Las evaluaciones se realizaron en 5 animales por grupo experimental, de los cuales se contemplaron para el análisis de 5 a 6 secciones del hipocampo dorsal por animal. Se realizó la evaluación de tres áreas de cada hemisferio por tejido y se obtuvo el promedio del número de células positivas por área (0.112 mm²).

6.12 Determinación de citocinas por el método de ELISA en sandwich

Terminadas las pruebas conductuales los animales fueron sometidos a eutanasia mediante decapitación para la obtención del cerebro y la disección del hipocampo dorsal. El cerebro de cada sujeto de experimentación fue colocado en una platina fría para posteriormente realizar cortes coronales a 150 μm en un vibratomo (VT1000 Leica Germany) y posteriormente la disección del hipocampo dorsal. Obtenidos los cortes coronales se realizó la disección de la porción que corresponde al tejido del hipocampo dorsal; el cual se almacenó en hielo seco para su posterior homogenización. Los tejidos obtenidos fueron pesados y homogenizados en buffer lisis. Los homogenizados se mantuvieron en hielo y en agitación constante por dos horas a 4 °C. Posteriormente fueron centrifugados a 12,500 rpm durante 30 minutos a 4 °C en una microcentrifuga refrigerada (NIKRO 200R, EUA). Se recuperó el sobrenadante que corresponde al extracto citoplasmático y se almacenó a -80 °C.

La concentración de IL-1 β , TNF- α e IFN- γ en hipocampo se cuantificó por el método cuantitativo de ELISA en sandwich (R&D Systems). Las placas de ELISA están diseñadas con un anticuerpo policlonal específico para IL-1 β , TNF- α o IFN- γ . Se colocaron 50 μL de diluyente RD1-21 en cada pozo de la microplaca para la activación del anticuerpo. Posteriormente, se agregan 50 μL de los estándares, control o muestra en cada pozo y se mezcla la placa suavemente por 1 minuto. La placa fue incubada durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron cuatro lavados con el buffer de lavado (400 μL por lavado). Se agregaron 100 μL del conjugado de IL-1 β , TNF- α o IFN- γ en cada pozo y se incubó la placa durante 2 horas a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de incubación se realizaron cuatro lavados con el buffer de lavado (400 μL por lavado). Se agregaron 100 μL de solución sustrato a cada pozo y se incubó la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente, protegiendo de la luz. Al finalizar el tiempo de incubación se agregaron 100 μL de solución de paro a cada pozo para detener la reacción. Finalmente, se determinó la densidad óptica de cada pozo de los estándares y las muestras mediante un lector de microplacas BioTek a una longitud de onda de 450 nm. La intensidad de color es proporcional a la cantidad de citocinas. La

concentración de citocinas fue obtenida mediante la interpolación de las lecturas en la curva de calibración (Figura 16). Los datos obtenidos fueron expresados en picogramos por mililitro (pg/mL) como lo muestra el manual del kit de ELISA. La concentración mínima determinada por el kit es de 5 pg / mL.

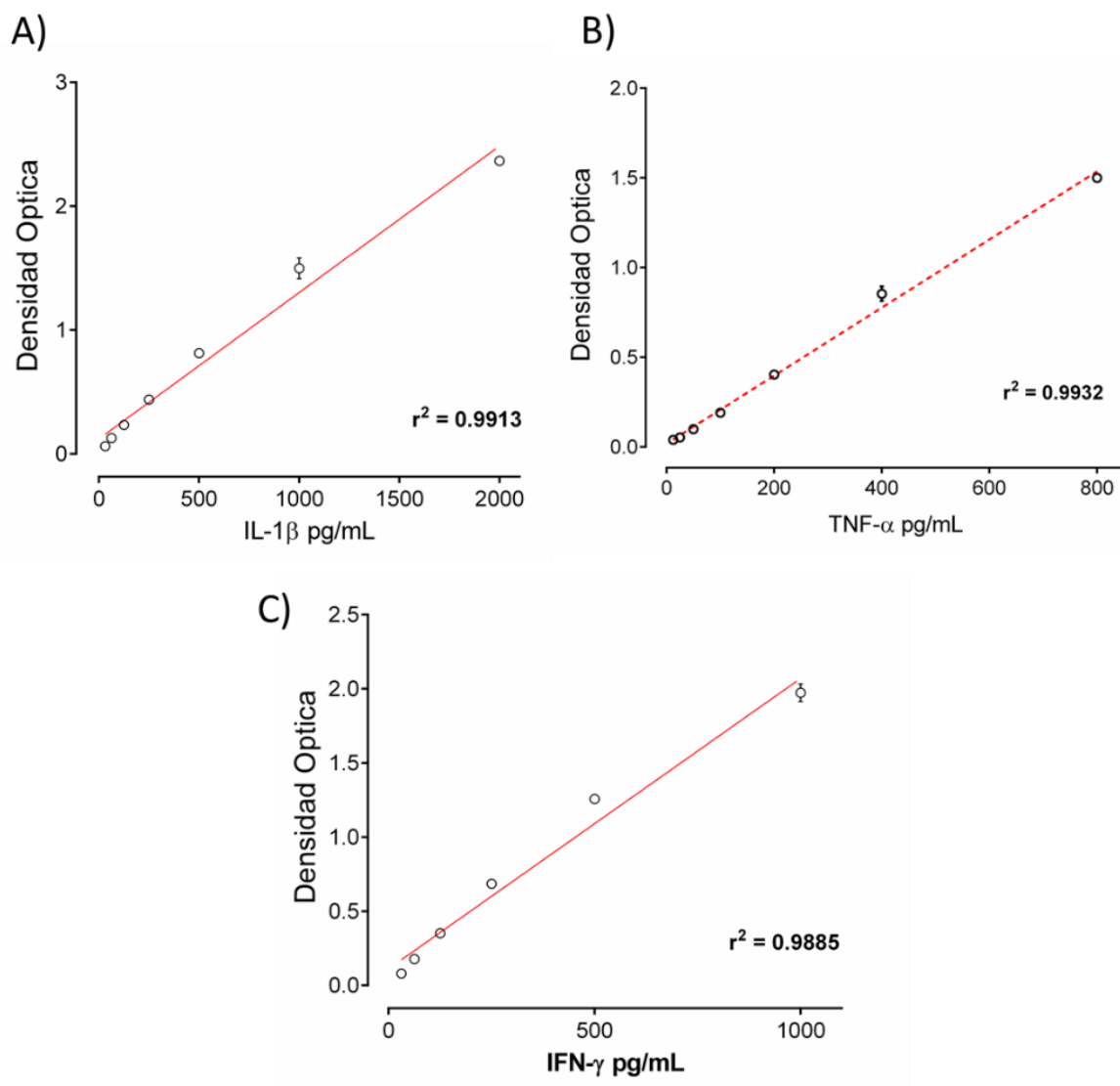


Figura 16. Curva de calibración para determinar la concentración de citocinas. La curva de calibración se realizó con estándares de IL-1 β , TNF- α e IFN- γ expresada en pg/ μ L, con respecto a las absorbancias obtenidas a 450 nm.

6.13 Obtención de extractos citoplásmicos

Terminadas las pruebas conductuales cinco animales de cada grupo fueron seleccionados al azar para ser sometidos a eutanasia y obtener el tejido cerebral. El cerebro de cada sujeto de experimentación fue colocado en una platina fría para posteriormente realizar cortes coronales del hipocampo dorsal por medio de un vibratomo (Leica VS100). Obtenidos los cortes coronales se realizó la disección de la porción que corresponde al tejido del hipocampo dorsal, el cual se almacenó en hielo seco para su posterior homogenización. Los tejidos obtenidos fueron pesados y homogenizados en buffer RIPA, el cual contiene: Tritón al 1 %; ortovanadato de sodio (NaVO_4) [1 mM]; fluoruro de sodio (NaF) [10 mM]; agua desionizada estéril; cloruro de sodio (NaCl) [150 mM]; Tris-(hidroximetil) aminometano (TRIS) [50 mM]; ácido etilendiamino tetracético (EDTA) [50 mM]; ácido etilenglicol tetracético (EGTA) [1 mM]; dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0.1 %; deoxicolato de sodio (DCNa) al 0.5 %; fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) [1 mM]; coctel de inhibidores de proteasas. Los homogenizados se mantuvieron en hielo y en agitación constante por dos horas a 4 °C. Posteriormente fueron centrifugados a 12,500 rpm durante 30 minutos a 4 °C en una microcentrifuga refrigerada (NIKRO 200R, EUA). Se recuperó el sobrenadante que corresponde al extracto citoplasmático y se almacenó a -80 °C.

6.14 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Las proteínas totales se determinaron por el método de Bradford, el cual está basado en el cambio de color que manifiesta el colorante azul brillante de Coomassie en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas, ya que este compuesto interacciona con los a.a. básicos (especialmente arginina) y los a.a. aromáticos. Dependiendo de la concentración de proteínas en una muestra se genera una coloración que va del carmín al azul. Se realizó una curva de calibración empleando estándares a diferentes concentraciones de BSA (0.0125, 0.025, 0.0375, 0.075, 0.15, 0.1875, 0.225 y 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en un volumen final de 80 μL . La solución madre se preparó pesando 1 mg de albúmina y fue disuelto en 4 mL de agua desionizada, lo cual es equivalente a una solución de 0.25 mg/mL, teniendo así 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Para determinar la cantidad de proteínas totales de los extractos citoplasmáticos, en una placa de ELISA se colocaron 20 μL de cada estándar o

muestra (por triplicado). Finalmente, se agregaron 180 μ L del reactivo de Bradford (azul brillante de Coomassie) a los estándares y a las muestras. Los estándares y muestras se incubaron por cinco minutos, la absorbancia fue determinada en un lector de microplacas (BioTek) a una longitud de onda de 630 nm. La concentración de proteínas totales fue obtenida interpolando los valores de las muestras en la curva de calibración.

6.15 Desnaturalización de proteínas

Una vez que se determinó la concentración de proteínas en el hipocampo dorsal se llevo a cabo la desnaturalización de estas. Se tomaron alícuotas de 20 μ g de proteína del hipocampo dorsal, a cada muestra se le agregó buffer de Laemmli en una relación 1:1. Posteriormente, las muestras se colocaron en un thermoblock (Labnet Digital Dry Bath) para ser sometidas a una temperatura de 95 °C por 5 minutos e inmediatamente ser colocadas en hielo para realizar un choque térmico. Finalmente, las muestras fueron almacenadas a 4 °C para ser utilizadas posteriormente para su detección por Western Blot.

6.16 Detección de proteínas por Western Blot

Las muestras de hipocampo dorsal (20 μ g de proteínas) se emplearon para la determinación de Gal-1 y Gal-3 por Western Blot. Las proteínas fueron separadas mediante una electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 15 % el corrimiento se realizó de 100 volts (V) durante 2 horas. Posterior a la separación, las proteínas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF; Immobilon P Millipore) en medio húmedo. Las condiciones de transferencia fueron 300 mA / 1.3 hs en una cámara Bio-Rad. Se corroboró la transferencia de proteínas tiñendo a las membranas con rojo de Ponceau (0.1%) y se marcó con tinta indeleble el indicador de peso molecular (Fermentas Life Sciences), posteriormente se lavó la membrana con TBS hasta remover el colorante. Se bloquearon las membranas con una solución de leche en polvo (Svelty, Nestle) al 5 % en TBS, durante 1 h en agitación a temperatura ambiente (TA), posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 min con TBS. Terminado el bloqueo, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes: Gal-1 mouse

monoclonal (1:200, Santa Cruz Biotechnology); Gal-3 mouse monoclonal (1:200, Santa Cruz Biotechnology); actina mouse monoclonal (1:1000, Millipore, MAB 1501-clona C4) durante la noche a 4 °C. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 5 min con una solución de leche en polvo al 1 % en TBS, posteriormente se incubó a la membrana con los anticuerpos secundarios acoplados a HRP goat anti-mouse IgG (1:3000, Millipore) durante 1 h. Posteriormente se realizaron 6 lavados de 5 min con leche al 1 % en TBS. Para revelar se usó un sustrato quimioluminiscente para la HRP (Immobilon Western, Millipore) y placas fotográficas (Kodak). Se digitalizaron las imágenes para un posterior análisis densitométrico en el programa Image J. Los datos fueron reportados como el promedio del índice entre la proteína Gal-1/actina, Gal-3/actina para cada uno de los grupos experimentales.

6.17 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos y gráficas se realizaron con el programa GraphPad PRISM versión 6.0. Se realizó el análisis de cada variable fisiológica para determinar si había diferencias entre los grupos experimentales. Los datos se expresaron como la media \pm SEM de cada grupo utilizado. Los valores de $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos en todas las pruebas. En la prueba conductual en el laberinto acuático de Morris se cuantificó la latencia a encontrar la plataforma de escape en la tarea de aprendizaje. Se analizó mediante una ANOVA de dos vías de medidas repetidas con un post test Bonferroni. En la prueba de memoria se analizó la latencia al primer cruce, el tiempo de permanencia en el cuadrante blanco, y el número de visitas, utilizando una ANOVA de una vía, seguido de un post-test Bonferroni. Los datos obtenidos de la longitud dendrítica por orden de ramificación por el análisis de Sholl se analizó mediante una ANOVA de dos vías, seguido de post test Bonferroni. Los datos obtenidos de la longitud dendrítica total se analizaron mediante una ANOVA de una vía, seguido de un post test Bonferroni. El análisis del número de células positivas a NeuN, BrdU, DCX, Galectina-1 y Galectina-3 se analizó usando un ANOVA de una vía seguido de un post test Bonferroni. El análisis de la concentración de citocinas IL-1 β , TNF- α e IFN- γ se realizó utilizando una ANOVA de una vía seguido de un post test Bonferroni.

7. Resultados

Diseño experimental 1

7.1 La administración del péptido A β ₂₅₋₃₅ en la región CA1 del hipocampo genera daño sobre la memoria espacial

En la parte superior de la Figura 17A se muestran las trayectorias de navegación, representativas del proceso de adquisición y localización de la plataforma de escape en el LAM para los grupos SSI y A β ₂₅₋₃₅. Los resultados obtenidos muestran una diferencia significativa al día siete en el tiempo de latencia a encontrar la plataforma de escape durante el aprendizaje para el grupo A β ₂₅₋₃₅ (44.32 ± 2 s, los datos corresponden al promedio \pm EEM) en comparación al grupo SSI (32.86 ± 2 s) (ANOVA de dos vías, $F(3,56) = 5.32$, $p < 0.01$) (Figura 16A).

El estudio de la memoria a largo plazo en el LAM al día 17 y 31 respecto a la administración del péptido A β ₂₅₋₃₅ en la región CA1 del hipocampo muestra un déficit cognitivo para el grupo A β ₂₅₋₃₅. En la parte superior de la Figura 17B se muestran las trayectorias de navegación representativas, que corresponden a la evaluación de la memoria en el LAM para los grupos SSI y A β ₂₅₋₃₅. Se observó que el número de cruces del cuadrante objetivo decreció al día 17 en el grupo A β ₂₅₋₃₅ (5.4 ± 0.3 cruces) en comparación con el grupo SSI (6.6 ± 0.3 cruces). En el día 31 para el grupo A β ₂₅₋₃₅ el número de cruces disminuyó (3.8 ± 0.5 cruces) en comparación con el grupo SSI (7.3 ± 0.4 cruces) (ANOVA de una vía $F(3,56) = 15.32$, $p < 0.001$).

Durante la fase de evocación, el tiempo para localizar el sitio donde se encontraba la plataforma (Figura 17C) aumentó significativamente el día 17 en el grupo A β ₂₅₋₃₅ (25.1 s \pm 4.3) en comparación al grupo SSI (10.9 s \pm 1), mientras que la evaluación del día 31 muestra que el grupo A β ₂₅₋₃₅ (38.8 s \pm 7) presenta un aumento significativamente mayor en comparación con el grupo SSI (12.4 s \pm 2) (ANOVA de una vía, $F(3,56) = 7.7$, $p < 0.001$). En consecuencia, los animales administrados con el péptido A β ₂₅₋₃₅ exploraron menos tiempo el cuadrante donde se encontraba la plataforma de escape, al día 17 el grupo A β ₂₅₋₃₅ (21.7 s \pm 1) disminuyó el tiempo de exploración registrado, en comparación al grupo SSI (26.6

s ± 1). Al día 31 en el grupo A β ₂₅₋₃₅ (16.0 s ± 2) disminuye en comparación al grupo SSI (26.0 s ± 1) (ANOVA de una vía F(3,56) = 11.40, p<0.001) (Figura 17D).

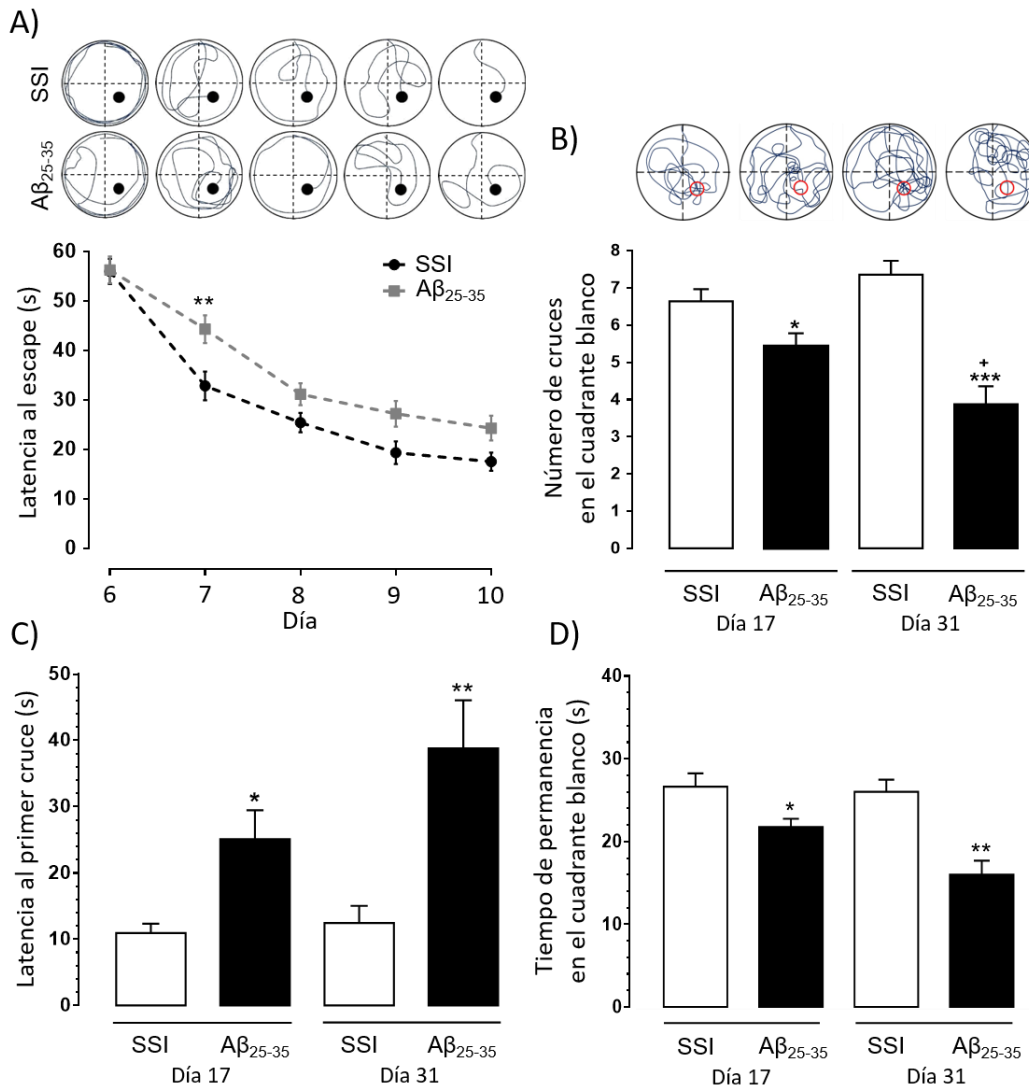


Figura 17. La administración del péptido A β ₂₅₋₃₅ en la región CA1 del hipocampo induce un daño en la memoria espacial. En A) en la parte superior se muestran las trayectorias de navegación que corresponden a la prueba de aprendizaje realizada del día 6 al 10 post administración del péptido A β ₂₅₋₃₅. En la parte inferior se muestra la latencia a encontrar la plataforma de escape por día de aprendizaje, los valores representan al promedio ± EEM (ANOVA de dos vías post-test Bonferroni vs Vehículo, **p<0,01). La evaluación de la memoria espacial se realizó en los días 17 y 31 en el LAM. En B) en la parte superior se muestran las trayectorias de navegación que corresponden a la evaluación de la memoria. En la parte inferior se muestra la grafica que corresponde al número de cruces en el cuadrante blanco. En C) se muestra el tiempo de latencia al primer cruce por el sitio donde se encontraba la plataforma de escape. En D) se muestra el tiempo de permanencia en el cuadrante blanco. Los valores corresponden al promedio ± EEM (ANOVA de una vía post-test Bonferroni vs SSI, * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001; A β ₂₅₋₃₅ día 32 vs A β ₂₅₋₃₅ día 17 *p <0.05).

7.2 El daño en la evocación de la memoria está asociado a los cambios morfológicos inducidos por el péptido $A\beta_{25-35}$ en el giro dentado

Se observó una disminución en la longitud dendrítica por orden de ramificación, en la longitud dendrítica total y en el número de espinas ante la administración del péptido $A\beta_{25-35}$ (Figura 18). Los cambios morfológicos fueron evidenciados por la tinción de Golgi-Cox y el análisis de Sholl.

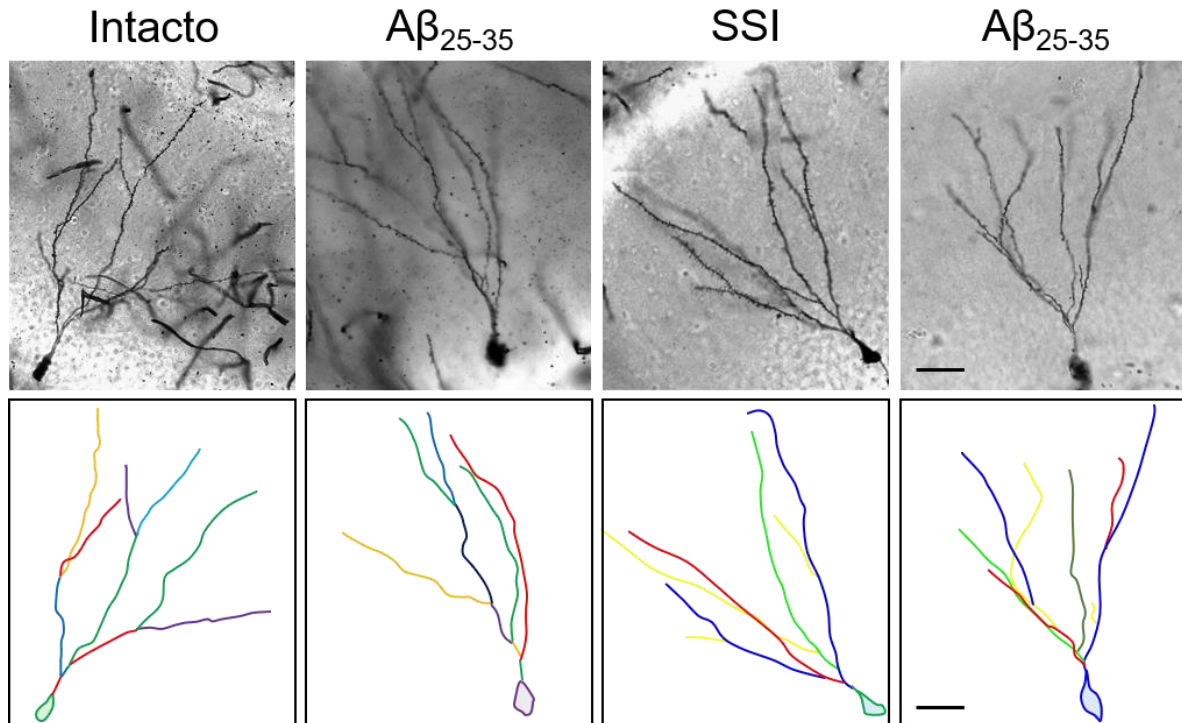


Figura 18. La administración del péptido $A\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo induce un cambio en la morfología de neuronas granulares de giro dentado. Se muestra en la parte superior una neurona granular del giro dentado que corresponden al día 32 posterior a la administración del péptido $A\beta_{25-35}$. La barra equivale a 20 μm .

Los resultados obtenidos muestran que el péptido $A\beta_{25-35}$ al día 11 no disminuye la longitud dendrítica en el GD respecto al grupo intacto (Figura 19A). Se observó que la prueba de aprendizaje realizada en el LAM facilitó el aumento en la longitud dendrítica. En el grupo SSI + A (aprendizaje) se observó un incremento en la longitud dendrítica en el cuarto orden de ramificación ($593.7 \mu\text{m} \pm 28$, los datos corresponden al promedio \pm EEM), sin embargo, no presenta diferencia significativa en comparación con el grupo Intacto ($460.0 \mu\text{m} \pm 51$). La longitud dendrítica por orden de ramificación para el grupo $A\beta_{25-35}$ + A fue mayor en los niveles de segundo

orden ($385.0 \mu\text{m} \pm 52$, $p < 0.01$) y de tercer orden ($626.8 \mu\text{m} \pm 62$, $p < 0.05$) en comparación con el grupo Intacto en el segundo orden ($193.7 \mu\text{m} \pm 38$, $p < 0.001$) y tercer orden ($489.0 \mu\text{m} \pm 73$). Sin embargo, se observó una reducción en el cuarto orden ($329.0 \mu\text{m} \pm 41$, $p < 0.05$) en comparación al cuarto orden del grupo Intacto ($460.0 \mu\text{m} \pm 51$) (ANOVA de dos vías $F(18,105) = 2.95$, $p < 0.01$).

El mismo análisis realizado al día 18 (Figura 19B) reveló una disminución significativa en la longitud dendrítica en el grupo $A\beta_{25-35}$ de quinto orden ($57.83 \pm 17 \mu\text{m}$,) en comparación al grupo Intacto. El grupo $A\beta_{25-35} + A-M$ (aprendizaje-memoria) mostró una longitud dendrítica mayor en el cuarto orden ($633.83 \pm 26 \mu\text{m}$) en comparación al grupo Intacto, mientras que el cambio morfológico en el orden dendrítico del grupo SSI + A-M fue mayor en el cuarto orden ($589.16 \pm 40.4 \mu\text{m}$), quinto orden ($600.33 \pm 19.6 \mu\text{m}$) y sexto orden ($301.0 \pm 26.4 \mu\text{m}$) en comparación con el grupo Intacto (ANOVA de dos vías $F(18,105) = 8.75$, $p < 0.001$).

El análisis de orden dendrítico al día 32 (Figura 19C) reveló una disminución significativa entre el grupo $A\beta_{25-35}$ ($57.17 \pm 15 \mu\text{m}$) y el grupo intacto en la porción terminal de la estructura dendrítica a nivel del quinto orden. Los animales tratados con $A\beta_{25-35} + A-M$ presentaron una menor longitud dendrítica a nivel del tercer orden ($392.5 \pm 25 \mu\text{m}$, $p < 0.001$) en comparación con el grupo Intacto. El grupo SSI + A-M mostró un incremento significativo en la longitud de orden dendrítico a niveles del cuarto orden ($591 \pm 51 \mu\text{m}$, $p < 0.01$) y de quinto orden ($389.7 \pm 21 \mu\text{m}$, $p < 0.001$) en comparación con el grupo Intacto (ANOVA de dos vías $F(18,105) = 2.9$, $p < 0.001$).

La evaluación de la longitud dendrítica total nos permite evaluar un cambio general a nivel de las neuronas granulares del giro dentado, es decir, si la neurona incrementó o disminuyó su longitud. El análisis de Sholl realizado al día 11 nos muestra diferencias significativas en la longitud dendrítica total para el grupo SSI + A ($1679 \mu\text{m} \pm 61$) en comparación con el grupo Intacto ($1387 \mu\text{m} \pm 67$). Se presenta una diferencia significativa mayor entre el grupo $A\beta_{25-35} + A$ ($1559 \mu\text{m} \pm 61$, $p < 0.01$) y el grupo $A\beta_{25-35}$ ($1232 \mu\text{m} \pm 13$) (ANOVA de una vía $F(3,15) = 11.44$, $p < 0.01$) (Figura 19D). La longitud dendrítica total en el día 18 muestra diferencias significativas entre el grupo SSI + A-M ($2070 \mu\text{m} \pm 61$) y el grupo Intacto ($1387 \mu\text{m}$

± 67 , $p < 0.001$). La longitud total dendrítica presenta una diferencia entre los grupos $A\beta_{25-35} + A-M$ ($1457 \mu\text{m} \pm 125$, $p < 0.05$) y $A\beta_{25-35}$ ($1115 \mu\text{m} \pm 19$), que disminuyen la longitud dendrítica respecto al tiempo (ANOVA de una vía $F(3,15) = 28.14$, $p < 0.05$) (Figura 19E). En el día 32, el grupo SSI + A-M ($1871 \mu\text{m} \pm 89$, $p < 0.001$) presentó un aumento en la longitud dendrítica total en comparación al grupo Intacto ($1387 \mu\text{m} \pm 66$, $p < 0.001$). La longitud dendrítica total registrada para el grupo $A\beta_{25-35}$ ($1078 \mu\text{m} \pm 28$, $p < 0.05$) muestra una disminución en comparación con el grupo Intacto (ANOVA de una vía $F(3,15) = 26.35$, $p < 0.05$) (Figura 19F).

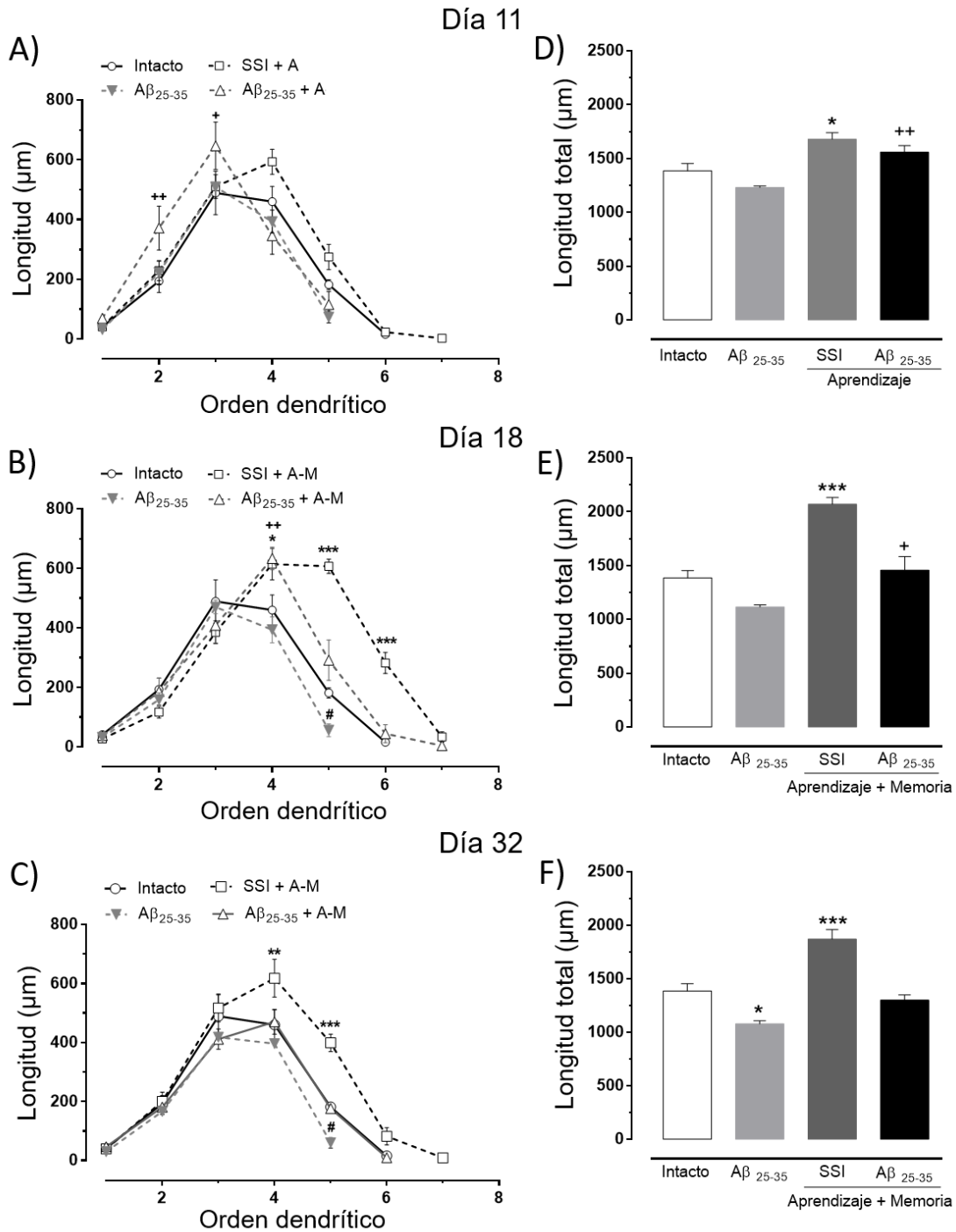


Figura 19. La administración del péptido $\text{A}\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo disminuyó la longitud dendrítica de las células del giro dentado. En A), B) y C) se muestra la longitud por orden dendrítico, que se evaluó al día 11, 18 y 32. Los datos graficados corresponden al promedio \pm EEM. (ANOVA de dos vías, post-test Bonferroni * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$), * Intacto vs SSI + A-M, # Intacto vs $\text{A}\beta_{25-35}$, + Intacto vs $\text{A}\beta_{25-35}$ + A-M. En D), E) y F) se muestra la longitud dendrítica total al día 11, 18 y 32. Los datos graficados corresponden al promedio \pm el EEM (ANOVA de una vía post-test Bonferroni, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, SSI + A-M vs $\text{A}\beta_{25-35}$ + A-M, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

7.3 La administración del péptido $A\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo disminuye la densidad de espinas dendríticas en el giro dentado

Con el fin de comprender el efecto del péptido $A\beta_{25-35}$ sobre el déficit cognitivo observado en el LAM se realizó la evaluación de la densidad de espinas dendríticas en las células granulares del GD. La cuantificación se realizó mediante la tinción de Golgi-Cox, cuyos resultados se ilustran en la Figura 20. Estos resultados muestran que la administración del péptido $A\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo dorsal disminuye el número de espinas dendríticas en las células granulares del GD. Se observó una disminución en la densidad de espinas dendríticas en el grupo $A\beta_{25-35}$ al día 18 (7.0 ± 0.2 , los datos corresponden al promedio \pm EEM, $p < 0.05$) y el día 32 (6.0 ± 0.2 , $p < 0.001$) en comparación con el grupo Intacto (7.7 ± 0.1). Para el día 32, el grupo $A\beta_{25-35} + A-M$ (6.0 ± 0.1 , $p < 0.001$) presentó una disminución en la densidad de la espina dendrítica en comparación con el grupo Intacto (7.7 ± 0.07). El análisis del grupo SSI + A-M reveló un aumento significativo en la densidad de la espina dendrítica al día 11 (10.5 ± 0.1), día 18 (10.1 ± 0.1) y día 32 (10.5 ± 0.2) en comparación con el grupo Intacto (7.7 ± 0.1 , $p < 0.001$) (ANOVA de una vía $F(3,15) = 26.35$, $p < 0.05$). En resumen, estos resultados indican que las espinas dendríticas aumentan en densidad en respuesta al aprendizaje espacial; sin embargo, el efecto neurotóxico a largo plazo del péptido $A\beta_{25-35}$ afecta significativamente la densidad de las espinas dendríticas en la región del GD (Figura 20).

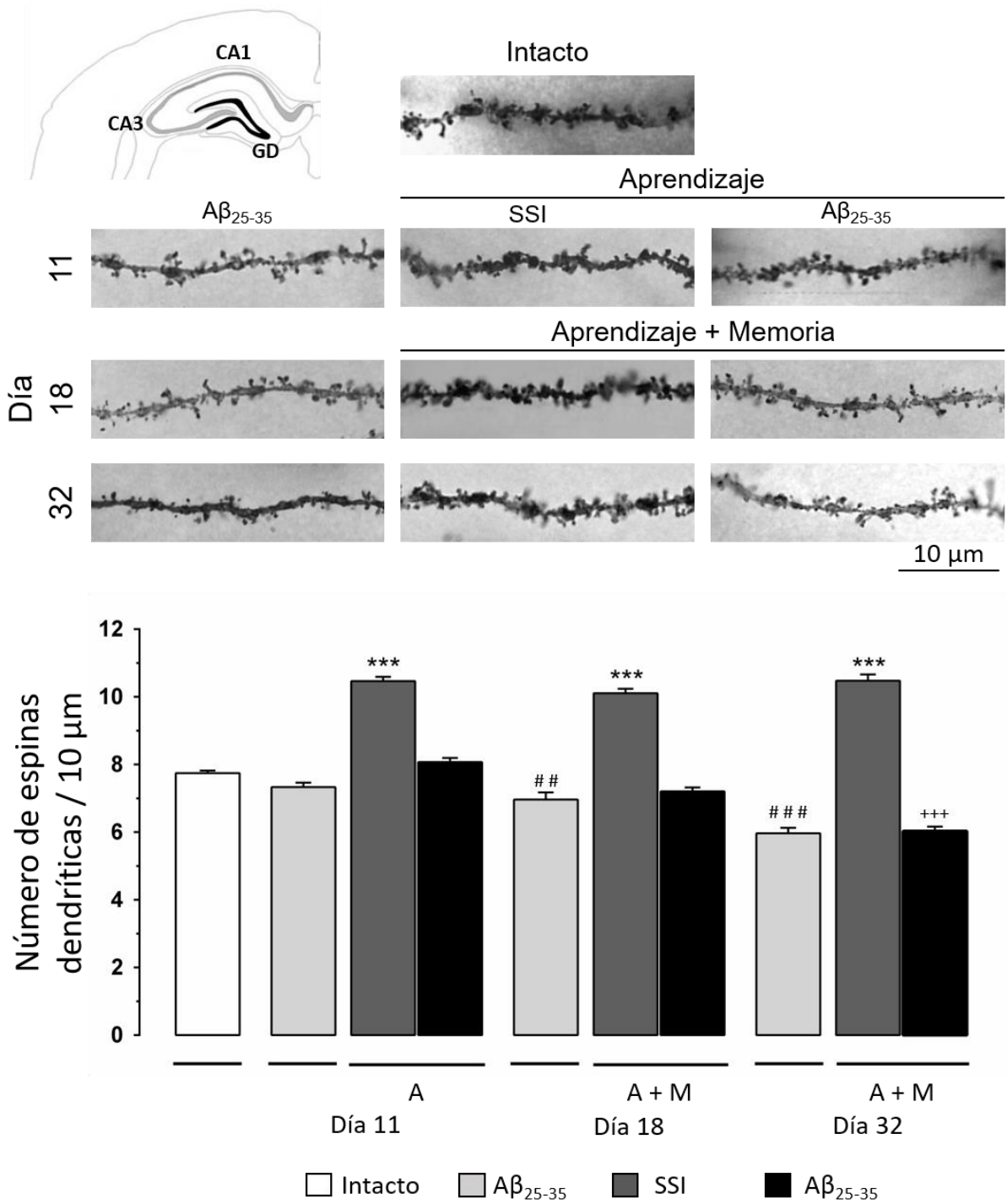


Figura 20. La administración del péptido Aβ₂₅₋₃₅ disminuye el número de espinas dendríticas en la región de GD. Se muestra la localización del GD en la formación del hipocampo. Se describe la densidad de espinas dendríticas por unidad de longitud de 10 μm en las dendritas distales de neuronas que fueron incluidas en el análisis de Sholl. El número de espinas dendríticas se evaluó a los días 11, 18 y 32. Se muestran las fotomicrografías de las espinas dendríticas en el GD. En el gráfico se muestra el promedio de las espinas dendríticas por cada 10 μm en la región del GD. Los datos corresponden al promedio ± EEM (ANOVA de una vía, post-test Bonferroni, * p <0.05, **p<0.01, *** p <0.001).

Diseño experimental 2

7.4 La administración del péptido A β ₂₅₋₃₅ en la región CA1 del hipocampo genera daño sobre la memoria a largo plazo

Los resultados obtenidos en la prueba de aprendizaje, al evaluar el tiempo de latencia a encontrar la plataforma de escape no muestran una diferencia significativa para el grupo A β ₂₅₋₃₅, SSI en comparación al grupo Intacto (ANOVA de dos vías $F(8,72) = 0.38$, $p > 0.05$) (Figura 21B). Se observó que el número de visitas al cuadrante blanco en la prueba de aprendizaje (Figura 21C), se presenta diferencia significativa en el día 7 para el grupo SSI (1.8 ± 0.2) respecto al grupo Intacto (2.7 ± 0.3) (ANOVA de una vía $F(2,41) = 15.28$, $p < 0.05$). En la parte inferior de la Figura 20C se muestran las trayectorias de navegación representativas, que corresponden a la evaluación de la memoria en el LAM para los grupos Intacto, SSI y A β ₂₅₋₃₅.

El estudio de evocación de la memoria a largo plazo en el LAM al día 17 y 31 respecto a la administración del péptido A β ₂₅₋₃₅ muestra un déficit cognitivo para el grupo A β ₂₅₋₃₅. La prueba de memoria en el LAM se realiza retirando la plataforma de escape, y se evalúa el trazado de las trayectorias de navegación, así como, el tiempo de latencia al primer cruce y el número de cruces por donde se localizaba la plataforma de escape. La evaluación del número de visitas al cuadrante objetivo en la prueba de memoria reveló una disminución al día 17 en el grupo A β ₂₅₋₃₅ (5.8 ± 0.3) en comparación con el grupo Intacto (7.1 ± 0.3) (Figura 22A) (ANOVA de una vía $F(2,41) = 15.62$, $p < 0.001$). En el día 31 de evaluación el grupo A β ₂₅₋₃₅ (5.1 ± 0.3) presentó una disminución en el número de visitas en comparación al grupo Intacto (7.2 ± 0.3) (Figura 22B) (ANOVA de una vía $F(2,41) = 14.11$, $p < 0.001$). En la evaluación de la memoria, el tiempo necesario para encontrar el sitio donde se encontraba la plataforma aumentó significativamente el día 17 en el grupo A β ₂₅₋₃₅ ($21.5 \text{ s} \pm 3.8$, los datos corresponde al promedio \pm EEM) con respecto al grupo Intacto ($10.3 \text{ s} \pm 1$) (Figura 22C) (ANOVA de una vía $F(2,27) = 4.85$, $p < 0.001$), mientras que, para el día 31, el grupo A β ₂₅₋₃₅ ($25.78 \text{ s} \pm 1.6$) mostró un aumento

significativamente mayor en comparación con el grupo Intacto ($9.2 \text{ s} \pm 1$) (ANOVA de una vía $F(2,27) = 40.81, p < 0.001$) (Figura 22D).

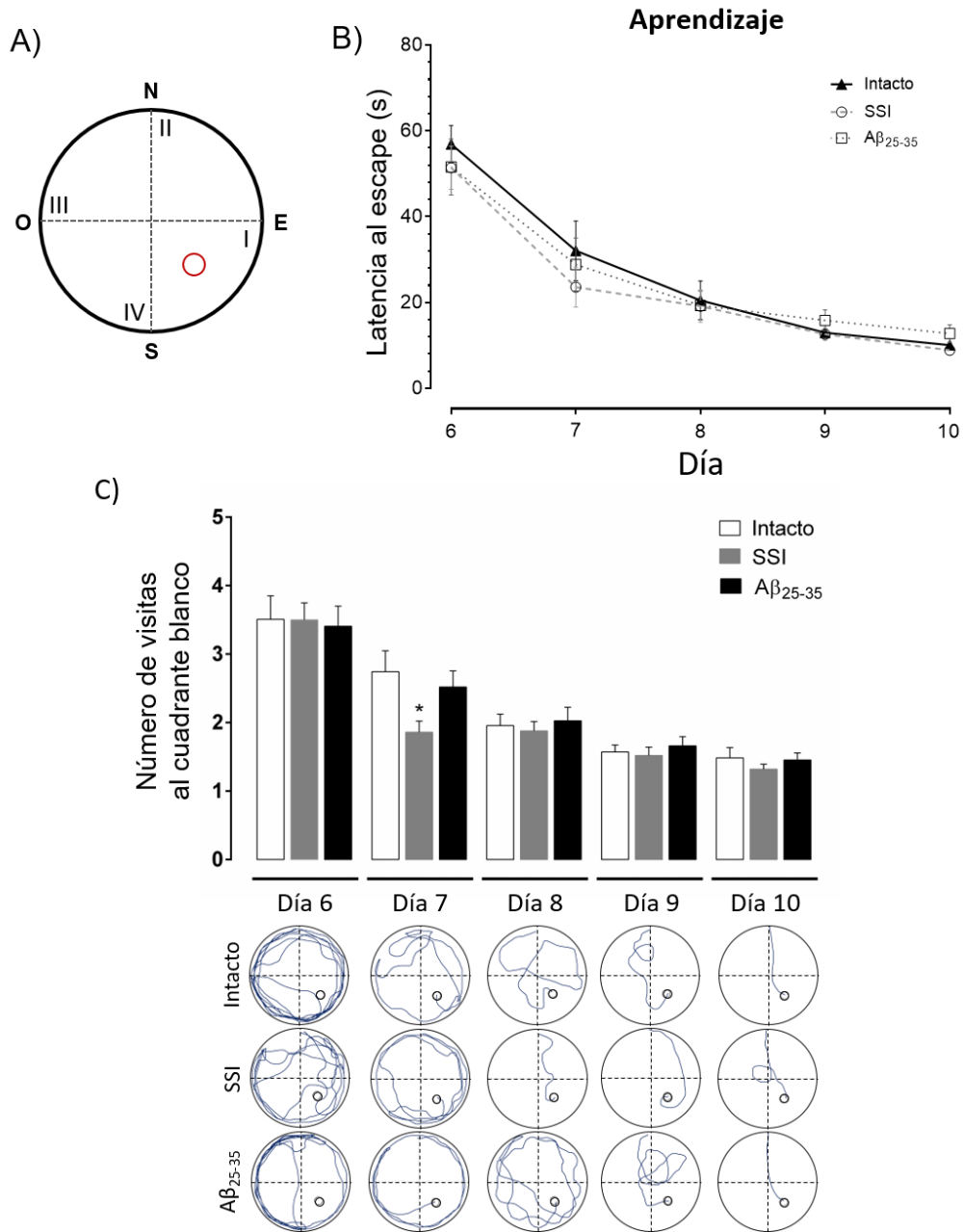


Figura 21. La administración del péptido Aβ₂₅₋₃₅ en la región CA1 del hipocampo no genera daño en el aprendizaje. En A) se muestra una representación del LAM, y la distribución de los cuadrantes respecto a los puntos cardinales. En B) se muestra el tiempo necesario para encontrar la plataforma de escape durante la prueba de aprendizaje. Los valores muestran el promedio del tiempo de latencia \pm EEM (ANOVA de dos vías, post-test Bonferroni, $p > 0.05$). En C) se muestra el número de visitas al cuadrante blanco y en la parte inferior las trayectorias de navegación representativas en la búsqueda de la plataforma de escape durante la prueba de aprendizaje. Los valores muestran al promedio \pm EEM (ANOVA de dos vías, post-test Bonferroni, $*p < 0.05$).

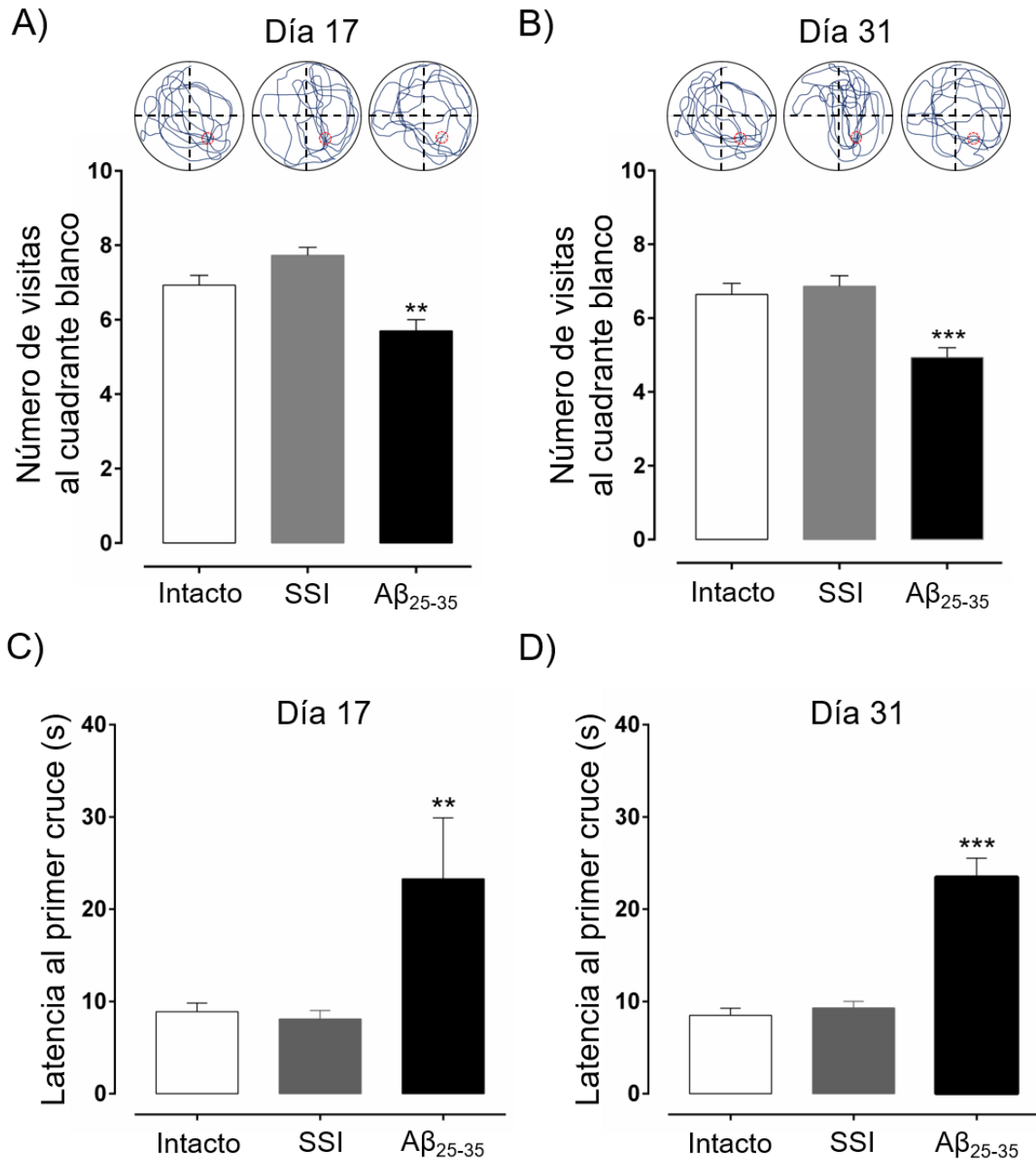


Figura 22. La administración del péptido A β_{25-35} en la región CA1 del hipocampo genera daño en la memoria a largo plazo. La prueba de memoria se realizó a los días 17 y 31 en el LAM. En A) se muestra al día 17 el número de visitas al cuadrante blanco donde se localizaba la plataforma de escape. En B) se muestra al día 31 el número de visitas al cuadrante blanco donde se localizaba la plataforma de escape. Los valores muestran al promedio \pm EEM (ANOVA de una vía, post-test Bonferroni, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). La prueba de memoria se realizó a los días 17 y 31 en el LAM. En C) se muestra el tiempo de latencia al primer cruce por donde se localizaba la plataforma de escape al día 17. En D) se muestra el tiempo de latencia al primer cruce por donde se localizaba la plataforma de escape al día 31. Los valores muestran al promedio \pm EEM (ANOVA de una vía, post-test Bonferroni, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

7.5 El péptido A β_{25-35} disminuye el número de células positivas a NeuN

La consecuencia final de la toxicidad del péptido A β_{25-35} es la muerte neuronal, por lo que se evaluó el número de células positivas a la proteína neuronal específica (NeuN). Los resultados obtenidos al día 32 muestran en la región CA1 del hipocampo y GD una disminución del número de células positivas a NeuN (marca en rojo) en el grupo administrado con el péptido A β_{25-35} respecto al grupo intacto (Figura 23A). Los resultados cuantitativos de este estudio indicaron que en el día 32 el número de células positivas a NeuN en el grupo A β_{25-35} (27.8 ± 1 , los datos corresponden al promedio \pm EEM) disminuyó en comparación con el grupo intacto (43.2 ± 2) en la región CA1 del hipocampo (ANOVA de una vía $F(2,29) = 34.31$, $p < 0.01$). En la región de GD se demostró una disminución significativa en el grupo A β_{25-35} (120.8 ± 1) en comparación con el grupo intacto (143.3 ± 6) (ANOVA de una vía $F(2,29) = 21.53$, $p < 0.001$) (Figura 23B).

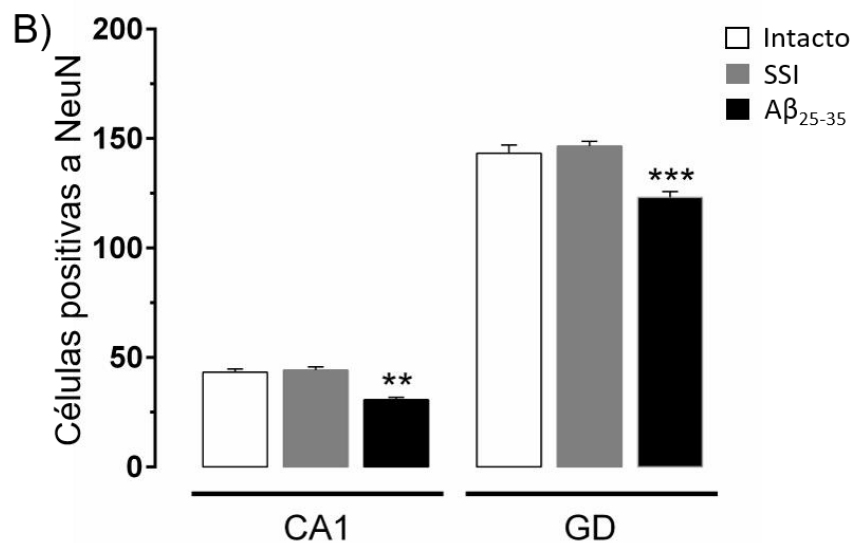
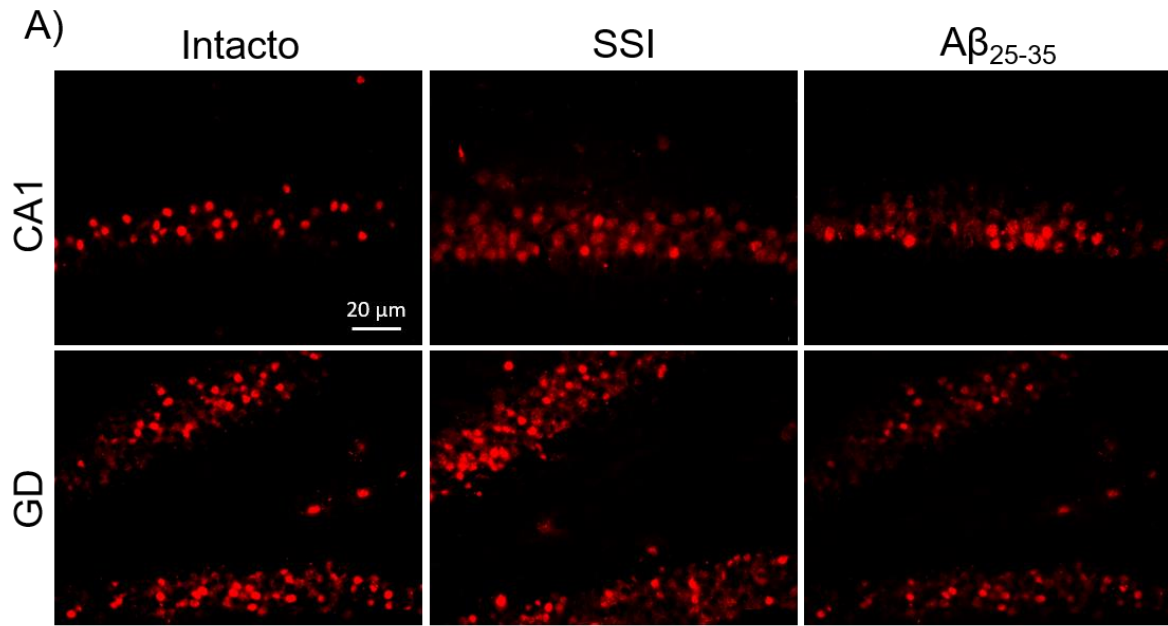


Figura 23. El péptido $A\beta_{25-35}$ disminuye la inmunoreactividad a NeuN en la CA1 del hipocampo y en el GD. En A) se muestran las fotomicrografías de la región CA1 del hipocampo y el DG, donde se observa la inmunoreactividad a NeuN en el día 32 posterior a la administración del péptido $A\beta_{25-35}$. En B) el gráfico muestra el número de células inmunorreactivas a NeuN en la región CA1 del hipocampo y el GD ($n = 5$ para cada grupo). Los datos corresponden al promedio \pm EEM (ANOVA de una vía, post-test Bonferroni, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

7.6 El péptido A β ₂₅₋₃₅ genera un daño sobre el proceso de neurogénesis

El presente trabajo evaluó la capacidad del sistema para generar nuevas células y la relación que tiene con el deterioro cognitivo. La proliferación celular en la ZSG de DG fue evidenciada por inmunohistoquímica. Se identificó la marca a BrdU, que fue administrada el día 31 y evaluada su incorporación el día 32, respecto a la administración con el péptido A β ₂₅₋₃₅ (Figura 24A). El número total de células positivas a BrdU se muestra en la Figura 23B; se observa una diferencia significativa en la inmunorreactividad a BrdU entre el grupo A β ₂₅₋₃₅ (21.2 ± 1 , los datos corresponden al promedio \pm EEM) y el grupo Intacto (28.2 ± 1.3). La expresión de DCX se asocia con la migración de neuroblastos, que podría actuar como un indicador alternativo para la neurogénesis adulta (Couillard-Despres y cols., 2005). Este estudio investigó la expresión de DCX en la ZSG del DG a los 32 días después de la administración de péptido A β ₂₅₋₃₅. Es interesante observar la morfología de las células positivas a DCX en los grupos Intacto y SSI, que se encuentran principalmente en la ZSG adyacente al margen interno de la capa de células granulares, característica que no presenta el grupo administrado con el péptido A β ₂₅₋₃₅. Las nuevas neuronas o células positivas a DCX se visualizaron en la capa de células granulares, así como también se extendía más allá de la capa molecular. Sin embargo, algunas de las células en el grupo A β ₂₅₋₃₅ no presentaban una estructura definida y otras se asemejaban a neuroblastos con orientación en paralelo a la capa de células granulares (Figura 24A). Los resultados revelaron una diferencia significativa en el número de células positivas a DCX en el grupo A β ₂₅₋₃₅ (29.7 ± 1.6 , los datos corresponden al promedio \pm EEM) en comparación con aquellos en el grupo Intacto (29.8 ± 1.6) (ANOVA de una vía, $F(5,48) = 34.45$, $p < 0.001$) (Figura 24B). Los resultados obtenidos indican que el péptido A β ₂₅₋₃₅ disminuye el número de neuronas, la proliferación celular y la neurogénesis, que pueden estar asociadas con el deterioro cognitivo.

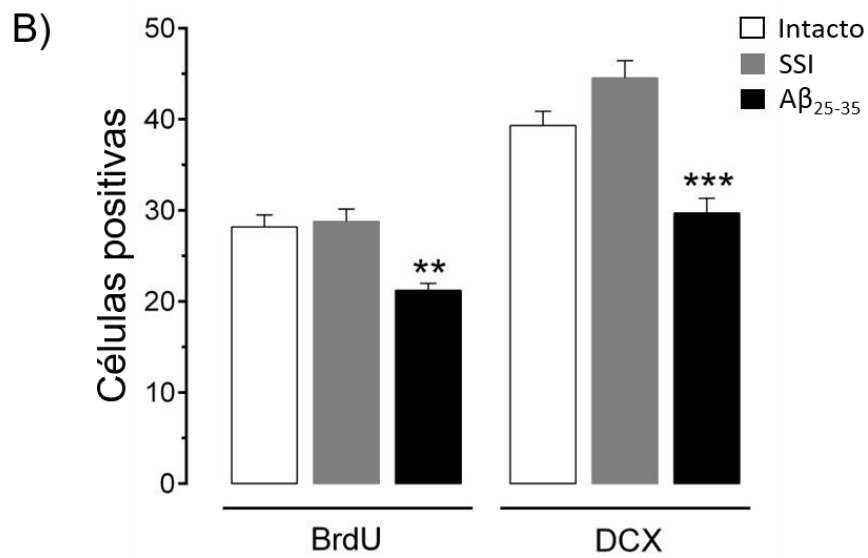
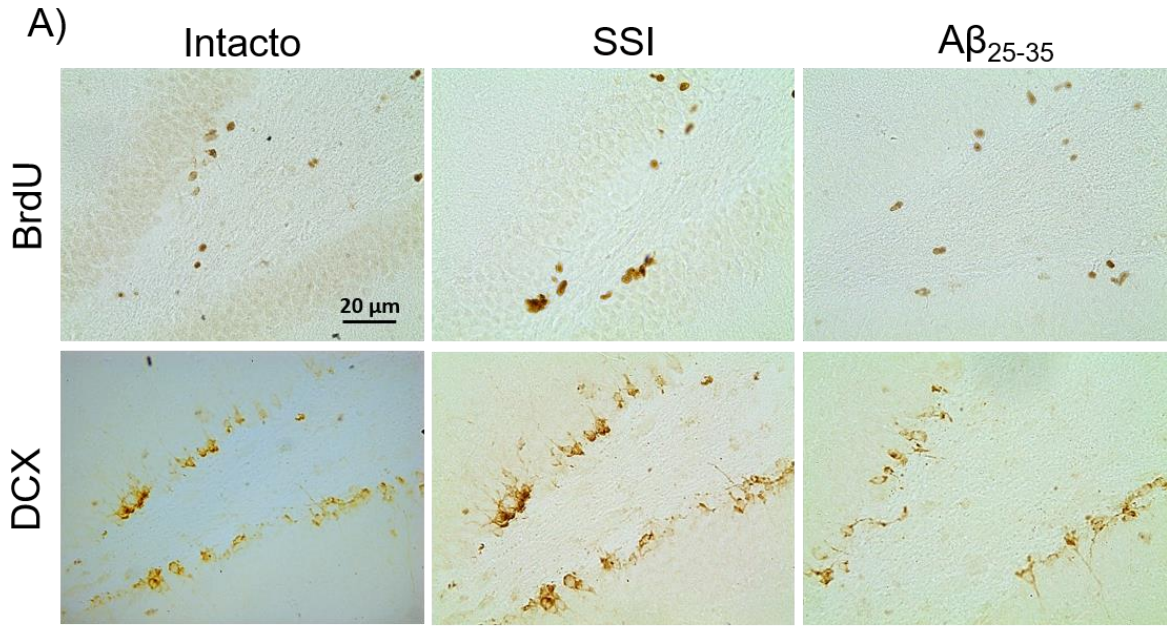


Figura 24. La administración del péptido $A\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo decrece la neurogénesis en la región del GD. En A) se muestra la inmunoreactividad a BrdU y DCX en el DG al día 32 posterior a la administración del péptido $A\beta_{25-35}$. En B) se muestra la cuantificación del número de células con inmunoreactividad a BrdU y DCX en la región del GD. Los datos corresponden al promedio \pm EEM (ANOVA de una vía, post-test Bonferroni, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

7.7 El péptido $A\beta_{25-35}$ induce neuroinflamación en el hipocampo dorsal

La respuesta de neuroinflamación inducida por astrocitos y microglia activados es un elemento clave en los trastornos neurodegenerativos. La administración del péptido $A\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo indujo la neuroinflamación asociada con un aumento de astrocitos y microglia (Figura 25).

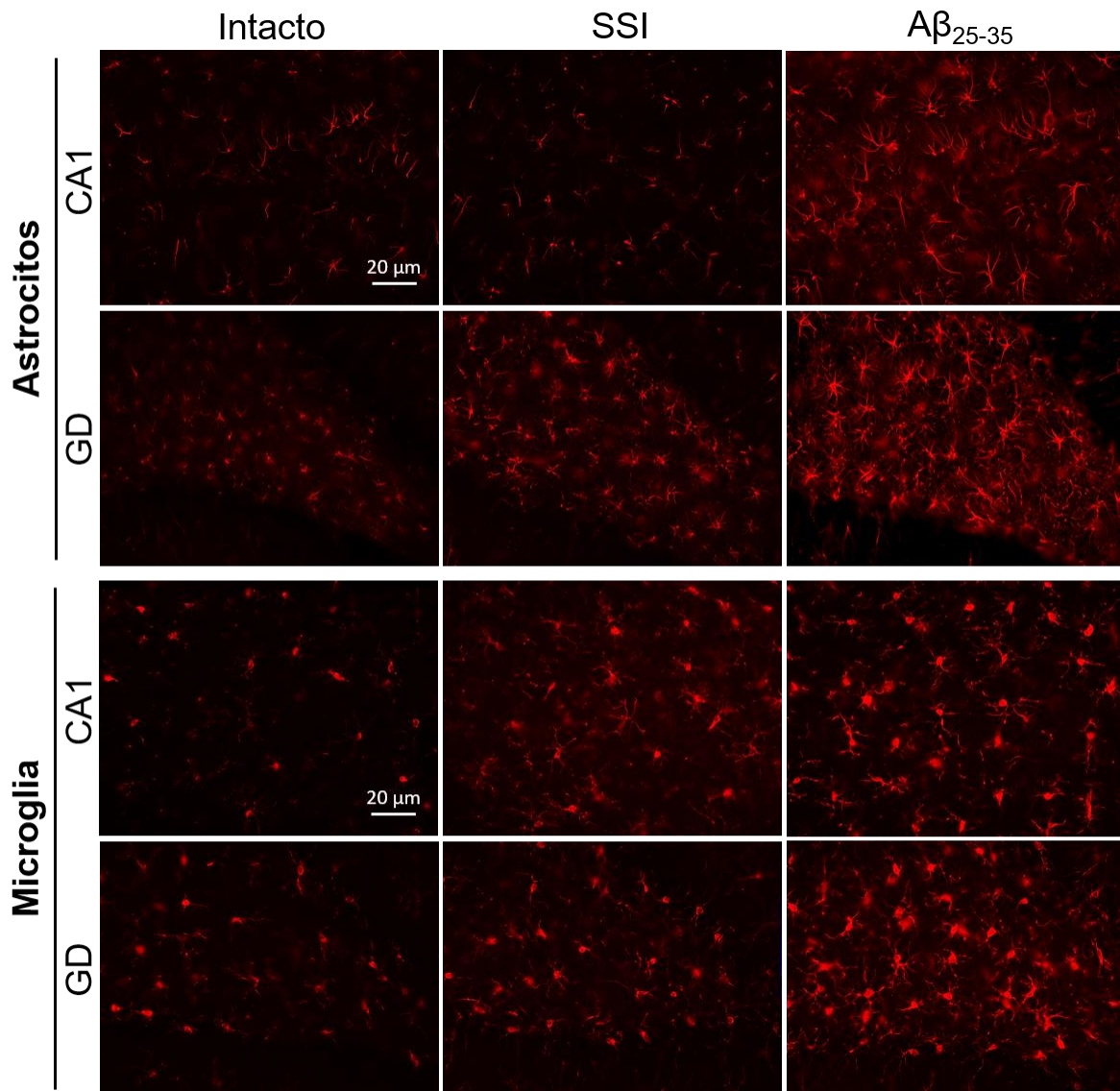


Figura 25. La administración del péptido $A\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo induce un incremento en la inmunorreactividad de astrocitos y microglia. Se muestra la inmunorreactividad a GFAP (astrocitos) e Iba1 (microglia) en la región CA1 del hipocampo y la región del DG al día 32 posterior a la administración del péptido $A\beta_{25-35}$.

El análisis cuantitativo llevado a cabo en este estudio indicó que el péptido A β ₂₅₋₃₅ induce un proceso de neuroinflamación al aumentar el número de células positivas a GFAP (astrocitos). En la región CA1 del hipocampo (Figura 26A), el número de células positivas para GFAP en el grupo A β ₂₅₋₃₅ (48.2 ± 1 , los datos corresponden al promedio \pm EEM) aumentó en comparación con el grupo Intacto (22.9 ± 0.8). En el GD (Figura 26A), el número de células positivas para GFAP en el grupo A β ₂₅₋₃₅ (61.3 ± 2.4) presentó un aumento en comparación con el grupo Intacto (26.5 ± 1.4) (ANOVA de una vía $F(5,78) = 137.7$, $p < 0.001$). El análisis del número de células positivas a Iba1 (microglía) en la región CA1 del hipocampo (Figura 26B) mostró que el grupo A β ₂₅₋₃₅ (29 ± 0.5 , los datos corresponden al promedio \pm EEM) aumentó en comparación con el grupo Intacto (18.2 ± 0.4) (ANOVA de una vía, post-test Bonferroni, $p < 0,001$). En el GD (Figura 26B) el número de células positivas a Iba1 en el grupo A β ₂₅₋₃₅ (25 ± 1) presentó un aumento en comparación con el grupo de Intacto (19.4 ± 0.8) (ANOVA de una vía $F(5,79) = 44.34$, $p < 0.001$).

La concentración de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α e IFN- γ se determinó por la técnica de ELISA de tipo sándwich en los homogenizados del hipocampo dorsal de ratas administradas con el péptido A β ₂₅₋₃₅, SSI y grupo Intacto al día 32. La concentración de IL-1 β (Figura 26C) en el hipocampo dorsal aumento en el grupo A β ₂₅₋₃₅ ($364.6 \text{ pg/mL} \pm 21$) en comparación con el grupo Intacto ($151.2 \text{ pg/ml} \pm 29$) (ANOVA de una vía $F(2,9) = 30.34$, $p < 0.001$). El incremento de la citocina IL-1 β se correlaciona con un aumento en TNF- α , asociad a la inducción de una respuesta neuroinflamatoria después de la administración del péptido A β ₂₅₋₃₅. La citocina TNF- α (Figura 26D) aumentó significativamente para el grupo A β ₂₅₋₃₅ ($215.7 \text{ pg/mL} \pm 21$) en el hipocampo dorsal en comparación con el grupo Intacto ($71.55 \text{ pg/mL} \pm 20$) (ANOVA de una vía $F(2,12) = 26.31$, $p < 0.001$). Cuando se comparó con la concentración de IFN- γ en el hipocampo dorsal (Figura 26E), se encontró un aumento para el grupo A β ₂₅₋₃₅ ($71 \text{ pg/mL} \pm 3.5$) en comparación con el grupo Intacto ($37 \text{ pg/mL} \pm 1.1$) (ANOVA de una vía $F(2,12) = 26.63$, $p < 0.01$).

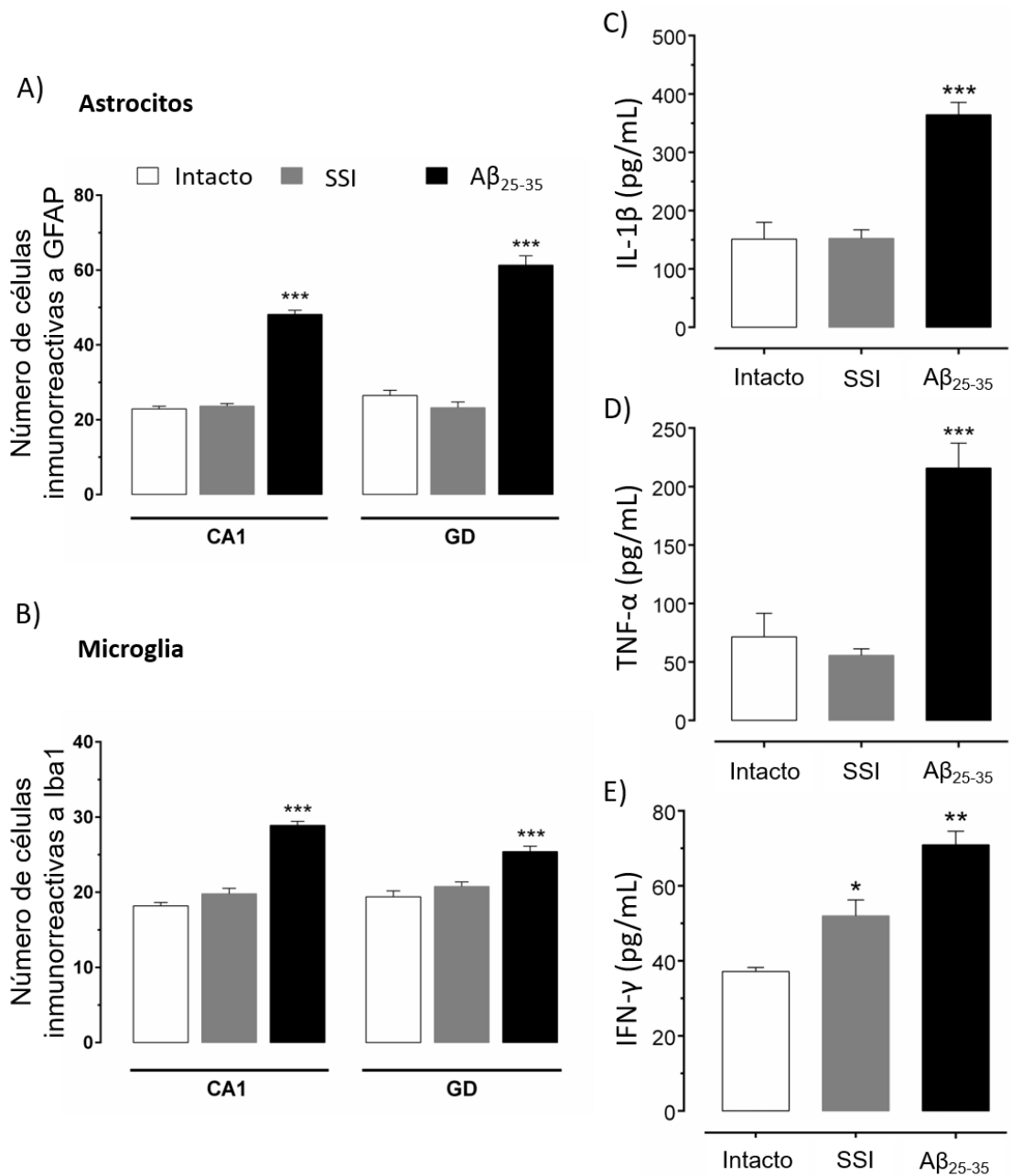


Figura 26. La administración del péptido Aβ₂₅₋₃₅ en la región CA1 del hipocampo induce un proceso de neuroinflamación. El número de células positivas a A) GFAP e B) Iba1 en la CA1 del hipocampo y el GD se correlacionaron con la actividad de astrocitos y microglia en el día 32. La concentración de IL-1β en C), TNF-α en D) e IFN-γ en E) se evaluó 32 días después de la administración del péptido Aβ₂₅₋₃₅. Los datos corresponden al promedio ±EEM (ANOVA de una vía, post-test Bonferroni, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

7.8 La administración del péptido A β ₂₅₋₃₅ induce la expresión de Galectina-3

La administración del péptido A β ₂₅₋₃₅ en el CA1 del hipocampo induce un incremento en la expresión de Gal-1 y Gal-3. Los datos experimentales obtenidos por la técnica de Western Blot muestran un incremento en la expresión de Gal-3 en la formación hipocampal (Figura 27A). El análisis de la densitometría no muestra diferencia significativa entre en el índice Gal-1/Actina para el grupo A β ₂₅₋₃₅ (1.2 ± 0.12 , los datos corresponden al promedio \pm EEM) respecto al grupo Intacto (0.86 ± 0.2) (ANOVA de una vía $F(2,6) = 2.24$, $p > 0.05$) (Figura 27B). Sin embargo, el análisis de la densitometría para el índice Gal-3/Actina muestra diferencia significativa entre el grupo A β ₂₅₋₃₅ (1.5 ± 0.08 , los datos corresponden al promedio \pm EEM) respecto al grupo Intacto (1.01 ± 0.16) (ANOVA de una vía $F(2,6) = 5.71$, $p < 0.05$) (Figura 27C).

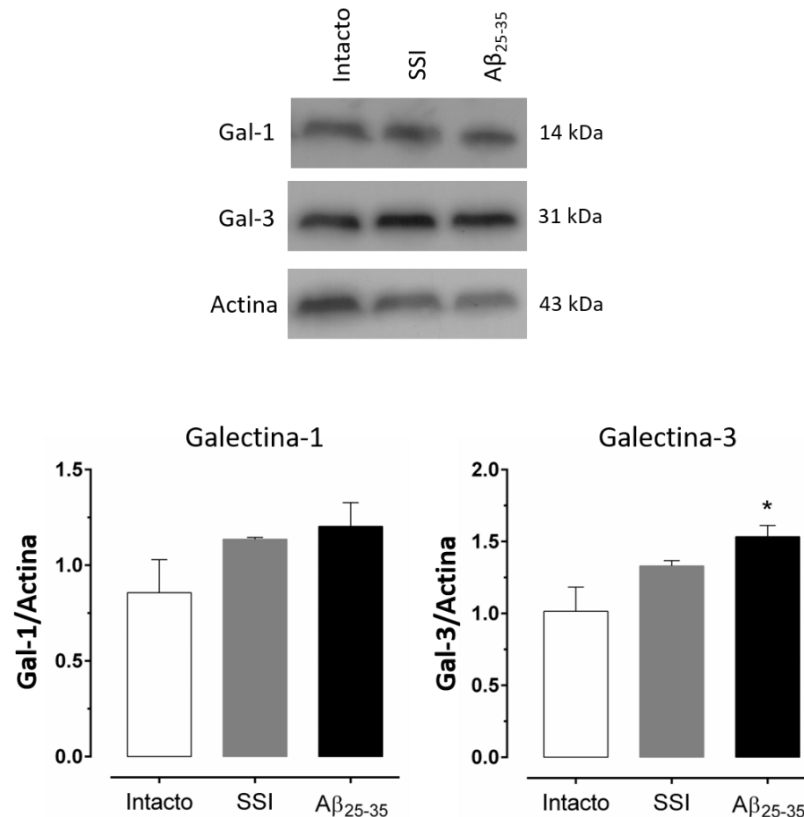


Figura 27. La administración del péptido A β ₂₅₋₃₅ en la región CA1 del hipocampo incrementa la expresión de Gal-3 en la formación hipocampal. En A) se muestra el Western Blot representativo para la determinación de Gal-1 y Gal-3. En B) y C) se muestran las determinaciones del índice Galectina/Actina al día 32 ante la administración del péptido A β ₂₅₋₃₅. Los datos corresponden al promedio \pm EEM (ANOVA de una vía, post-test, Bonferroni * $p < 0.05$).

7.9 El A β ₂₅₋₃₅ induce la activación de astrocitos y la expresión de Galectina-3

La evaluación de la inmunoreactividad a GFAP y colocación con Gal-1 y Gal-3 facilita la determinación de su participación en la neuroinflamación inducida por la administración del péptido A β ₂₅₋₃₅ en la región CA1 del hipocampo dorsal. Se observó un incremento en la inmunoreactividad a los astrocitos en el grupo A β ₂₅₋₃₅, sin embargo, no se mostraron diferencias significativas en el número de células inmunoreactivas a Gal-1 (Figura 28A).

El análisis cuantitativo del número total de células positivas a Gal-1 en la región CA1 del hipocampo (Figura 28B) no mostró diferencias significativas entre los grupos SSI (13.2 ± 0.7 , los datos corresponden al promedio \pm EEM) y A β ₂₅₋₃₅ (15.3 ± 0.7) en comparación con el grupo Intacto (13.0 ± 1). La colocación celular de GFAP-Gal-1 en la región CA1 del hipocampo (Figura 28B) no mostró diferencias significativas en el grupo A β ₂₅₋₃₅ (2.20 ± 0.6 , los datos corresponden al promedio \pm EEM) respecto al grupo Intacto (3.8 ± 1.3). Sin embargo, la comparación entre el número total de células positivas a Gal-1 y colocadas por grupo experimental presentan diferencias significativas (ANOVA de una vía, $F(5,49) = 17.49$, $p < 0.001$).

En GD, el número de células positivas a Gal-1 (Figura 28C) mostró un en el grupo SSI (13.3 ± 0.9) y en el grupo A β ₂₅₋₃₅ (11.8 ± 0.7) en comparación con el grupo de Intacto (6.2 ± 2). En GD (Figura 28C) la colocación GFAP-Gal-1 en el grupo SSI (5.4 ± 0.9) y en el grupo A β ₂₅₋₃₅ (2.3 ± 0.4) no mostraron diferencias significativas en comparación con el grupo Intacto (2.6 ± 0.7). Sin embargo, la comparación entre el número total de células positivas a Gal-1 y colocadas por grupo experimental presentan diferencias significativas (ANOVA de una vía, $F(5,49) = 39.7$, $p < 0.001$).

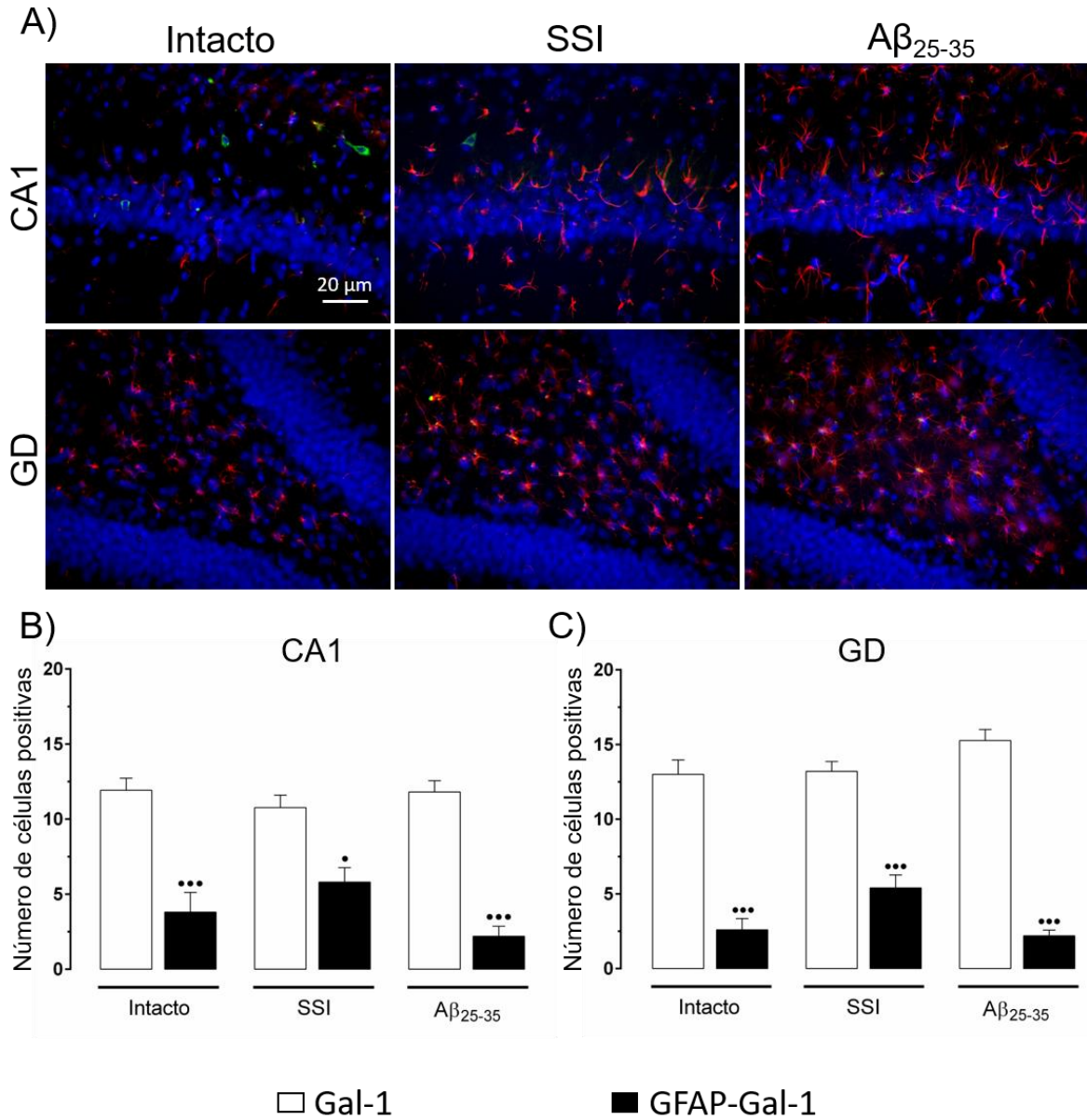


Figura 28. El péptido $A\beta_{25-35}$ no modifica la expresión de Gal-1 que está asociado con la activación de astrocitos en CA1 y GD. En A) se muestran las fotomicrografías de astrocitos (GFAP, rojo), Gal-1 (verde) y su colocalización (amarillo) al día 32. En B) se muestra el número de células positivas a Gal-1 y el número de células colocalizadas GFAP-Gal-1 en la región CA1 del hipocampo. En C) se muestra el número de células positivas a Gal-1 y el número de células colocalizadas GFAP-Gal-1 en GD. Los datos corresponden al promedio \pm EEM (ANOVA de una vía, post-test Bonferroni, total vs colocalización * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

La administración del péptido $A\beta_{25-35}$ indujo un aumento tanto en la inmunorreactividad a Galectina-3, como la colocalización con GFAP en CA1 y DG (Figura 29A). El análisis del número de células positivas a Gal-3 en la región CA1 del hipocampo (Figura 29B) mostró un aumento en el grupo SSI (13.3 ± 0.9 , los datos corresponden al promedio \pm EEM) y el grupo $A\beta_{25-35}$ (31.2 ± 1.3) en comparación con el grupo Intacto (8.53 ± 0.6). El análisis del número de células inmunorreactivas y colocalizadas a GFAP-Gal-3 en la región CA1 del hipocampo indicó un aumento significativo y constante en el grupo $A\beta_{25-35}$ (18.8 ± 1.5) en comparación con el grupo Intacto (8.2 ± 0.4). La comparación entre el número total de células positivas a Gal-3 (31.2 ± 1.3) y el número de células colocalizadas (18.8 ± 1.5) en el grupo grupo $A\beta_{25-35}$ muestran diferencias significativas (ANOVA de una vía, $F(5,54) = 80.35$, $p < 0.001$).

En GD, el análisis del número de células positivas a Gal-3 en la región CA1 del hipocampo (Figura 29C) mostró un aumento en el grupo $A\beta_{25-35}$ (27.3 ± 3.3 , los datos corresponden al promedio \pm EEM) en comparación con el grupo Intacto (13.4 ± 1.2). El número de células colocalizadas GFAP-Gal-3 incremento significativamente en el grupo $A\beta_{25-35}$ (20.6 ± 2.3) en comparación con el grupo Intacto (7 ± 0.5) (ANOVA de una vía, $F(5,30) = 11.52$, $p < 0.001$). Los resultados obtenidos indican que el péptido $A\beta_{25-35}$ induce la activación de astrocitos asociado con la respuesta de neuroinflamación, que incrementa significativamente la expresión de Gal-3, y puede estar implicado en el deterioro cognitivo.

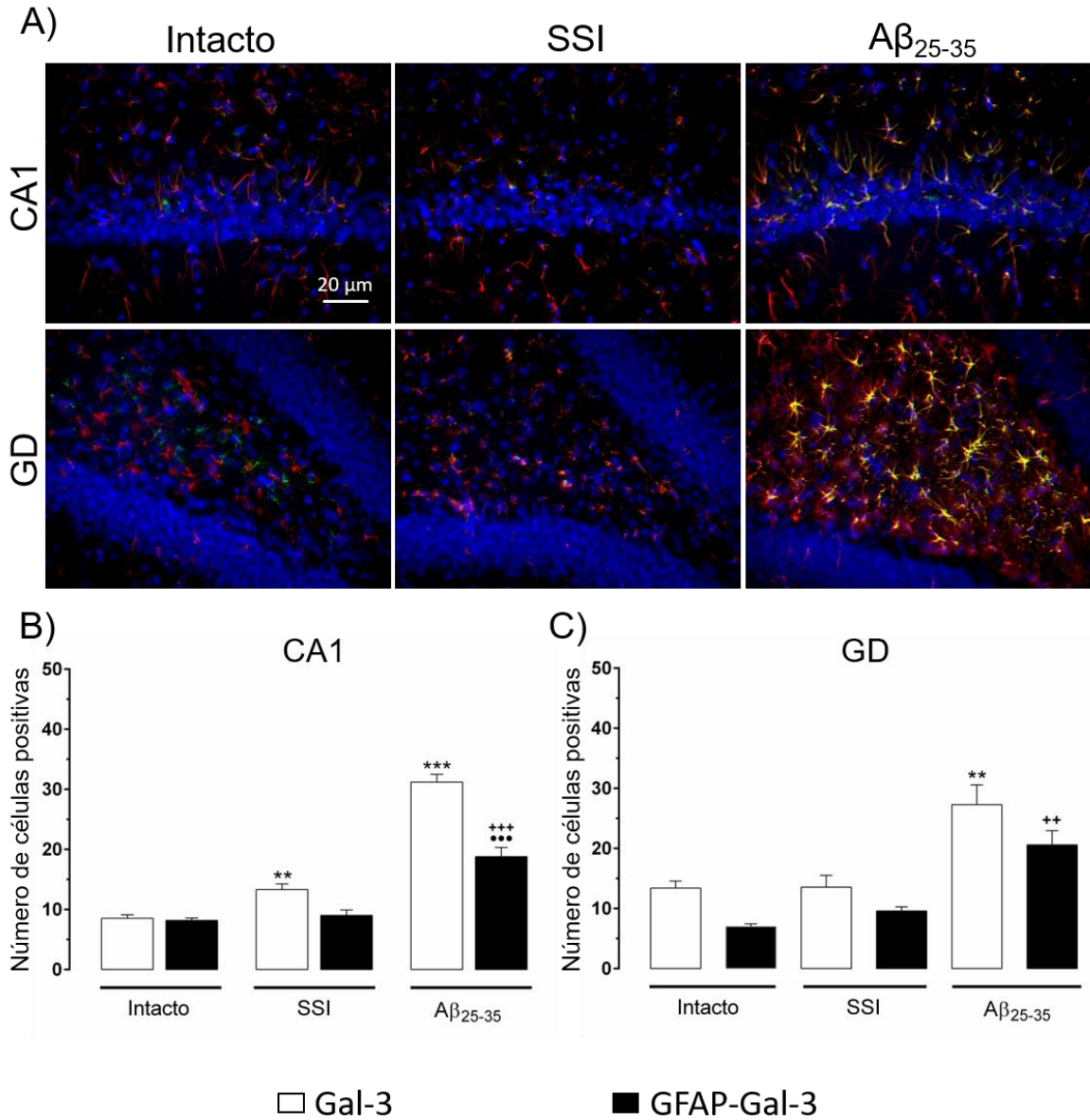


Figura 29. El péptido $A\beta_{25-35}$ incrementa la expresión de Gal-3 asociada a la activación de astrocitos en CA1 y GD. En A) se muestran las fotomicrografías de astrocitos (GFAP, rojo), Gal-3 (verde) y su colocalización al día 32. En B) se muestra el número de células positivas a Gal-3 y el número de células colocalizadas GFAP-Gal-3 en la región CA1 del hipocampo. En C) se muestra el número de células positivas a Gal-3 y el número de células colocalizadas GFAP-Gal-3 en GD. Los datos corresponden al promedio \pm EEM (ANOVA de una vía, post-test Bonferroni, Gal-1 ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; Iba1-Gal-1 ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; Gal-1 vs Iba1-Gal-1 *** $p < 0.001$).

7.10 El péptido A β ₂₅₋₃₅ induce la activación de microglia y la expresión de galectinas

La administración del péptido A β ₂₅₋₃₅ en el CA1 del hipocampo indujo tanto la neuroinflamación asociada a un aumento en la inmunorreactividad a Iba1 (microglia) como a la participación de Gal-1 y Gal-3. Los grupos experimentales mostraron un aumento en el número de células de microglia e inmunorreactividad a Gal-1 en el grupo A β ₂₅₋₃₅ respecto al grupo control, no se identificaron diferencias significativas en comparación con el grupo de Intacto (Figura 30A). En las fotomicrográficas, el grupo A β ₂₅₋₃₅ mostró un aumento en la inmunorreactividad a Iba1 y Gal-1 en CA1 y DG (Figura 30A).

El análisis del número de células positivas a Gal-1 en la región CA1 del hipocampo (Figura 30B) no mostró una diferencia entre el grupo A β ₂₅₋₃₅ (11.8 ± 0.75 , los datos corresponden al promedio \pm EEM) y el grupo del SSI (8.9 ± 0.9) en comparación al grupo de Intacto (11.92 ± 0.8) (ANOVA de una vía, post-test Bonferroni, $p > 0.05$). El análisis del número de células colocalizadas Iba1-Gal-1 en la región CA1 del hipocampo (Figura 30B) no mostró una diferencia entre el grupo A β ₂₅₋₃₅ (11 ± 1 , los datos corresponden al promedio \pm EEM) y el grupo del SSI (8.6 ± 1) en comparación al grupo de Intacto (8 ± 0.5) (ANOVA de una vía, $F(5,49) = 3.42$, $P = 0.0098$).

El número de células inmunorreactivas a Gal-1 en la región del GD (Figura 30C) no muestra diferencias significativas entre el grupo A β ₂₅₋₃₅ (15.3 ± 0.7) y el grupo SSI (13.2 ± 0.6) en comparación con el grupo Intacto (13 ± 1). El análisis del número de células colocalizadas Iba1-Gal-1 en la región CA1 del hipocampo (Figura 30B) no mostró una diferencia entre el grupo A β ₂₅₋₃₅ (11 ± 1 , los datos corresponden al promedio \pm EEM) y el grupo del SSI (8.6 ± 1) en comparación al grupo de Intacto (8 ± 0.5) (ANOVA de una vía, $F(5,49) = 2.47$, $P = 0.045$).

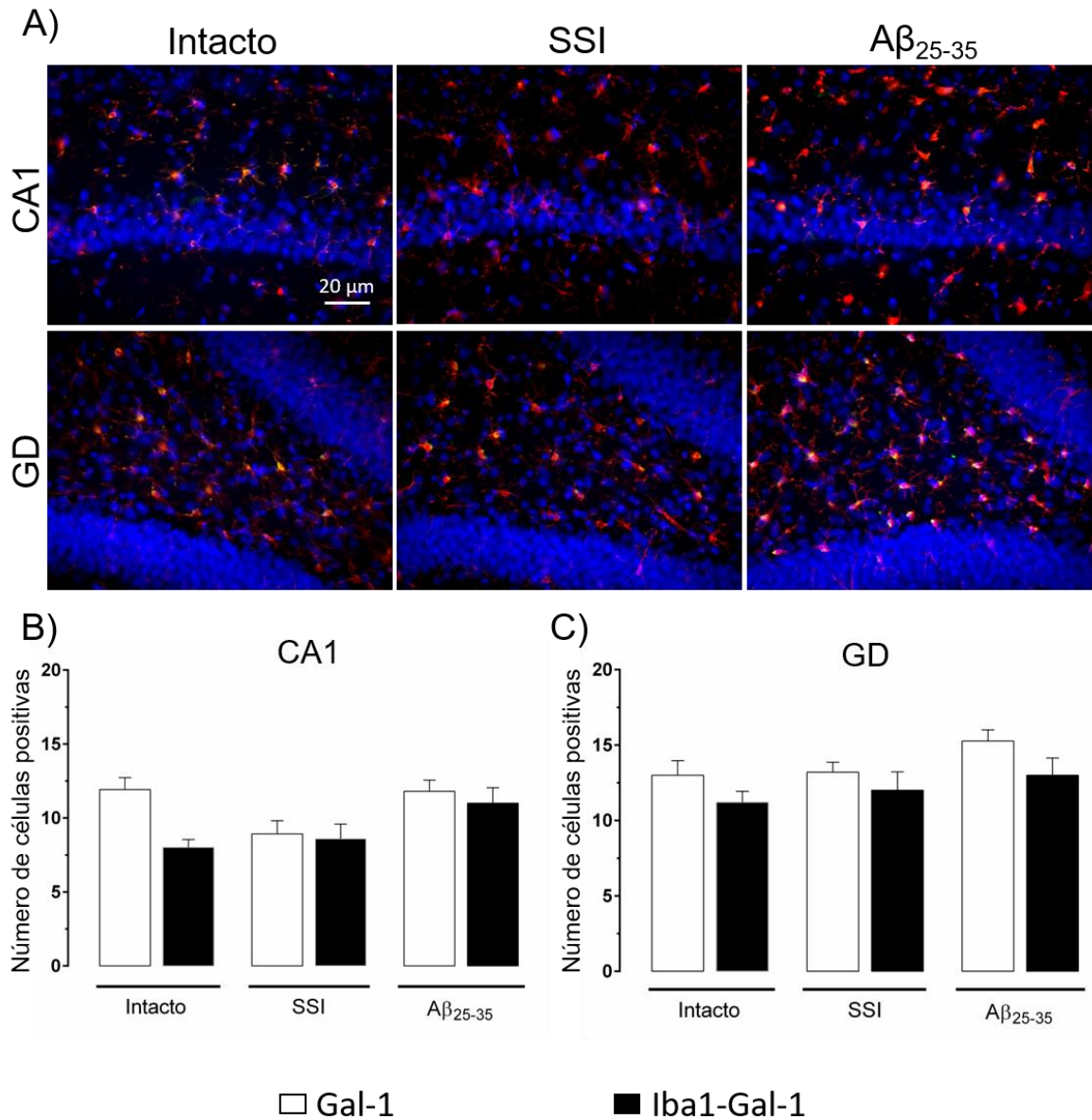


Figura 30. El péptido $A\beta_{25-35}$ no modifica la expresión de Gal-1 en células de la microglia asociado a la neuroinflamación en CA1 y DG. En A) se muestran las fotomicrografías de astrocitos (Iba1, rojo), Gal-1 (verde) y su colocalización (amarillo) al día 32. En B) se muestra el número de células positivas a Gal-1 y el número de células colocalizadas Iba1-Gal-1 en la región CA1 del hipocampo. En C) se muestra el número de células positivas a Gal-1 y el número de células colocalizadas Iba1-Gal-1 en DG. Los datos corresponden al promedio \pm EEM (ANOVA de una vía, post-test Bonferroni, $p > 0.05$).

El péptido A β ₂₅₋₃₅ indujo un aumento tanto en la inmunorreactividad a Gal-3 como en la colocalización con Iba1 en CA1 y GD (Figura 31A). El análisis del número de células positivas a Gal-3 en la región CA1 del hipocampo (Figura 31B) mostró un aumento en el grupo A β ₂₅₋₃₅ (31.2 ± 0.9 , los datos corresponden al promedio \pm EEM) en comparación con el grupo Intacto (8.5 ± 0.5) (ANOVA de una vía, post-test Bonferroni, $p < 0.001$). El análisis del número de células inmunorreactivas colocalizadas Iba1-Gal-3 en la región CA1 del hipocampo indicó un aumento en el grupo A β ₂₅₋₃₅ (13.0 ± 1.1) en comparación con el grupo Intacto (2.0 ± 0.5) (ANOVA de una vía $F(5,54) = 3.38$, $p < 0.001$).

En la región del GD el número de células inmunorreactivas a Gal-3 (Figura 31C) aumentó en el grupo A β ₂₅₋₃₅ (27.3 ± 3.3) en comparación con el grupo Intacto (13.40 ± 1.2). El número total de células colocalizadas Iba1-Gal-3 en la región de GD (Figura 31C) mostró un aumento significativo en el grupo A β ₂₅₋₃₅ (11.0 ± 1.2) en comparación con el grupo Intacto (0.3 ± 0.15) (ANOVA de una vía $F(5,41) = 41.76$, $p < 0.001$). Los resultados obtenidos indican que el péptido A β ₂₅₋₃₅ induce la activación de microglia e incremento en la expresión de Gal-1 y Gal-3, que puede estar asociado con la modulación del proceso de neuroinflamación y el deterioro cognitivo.

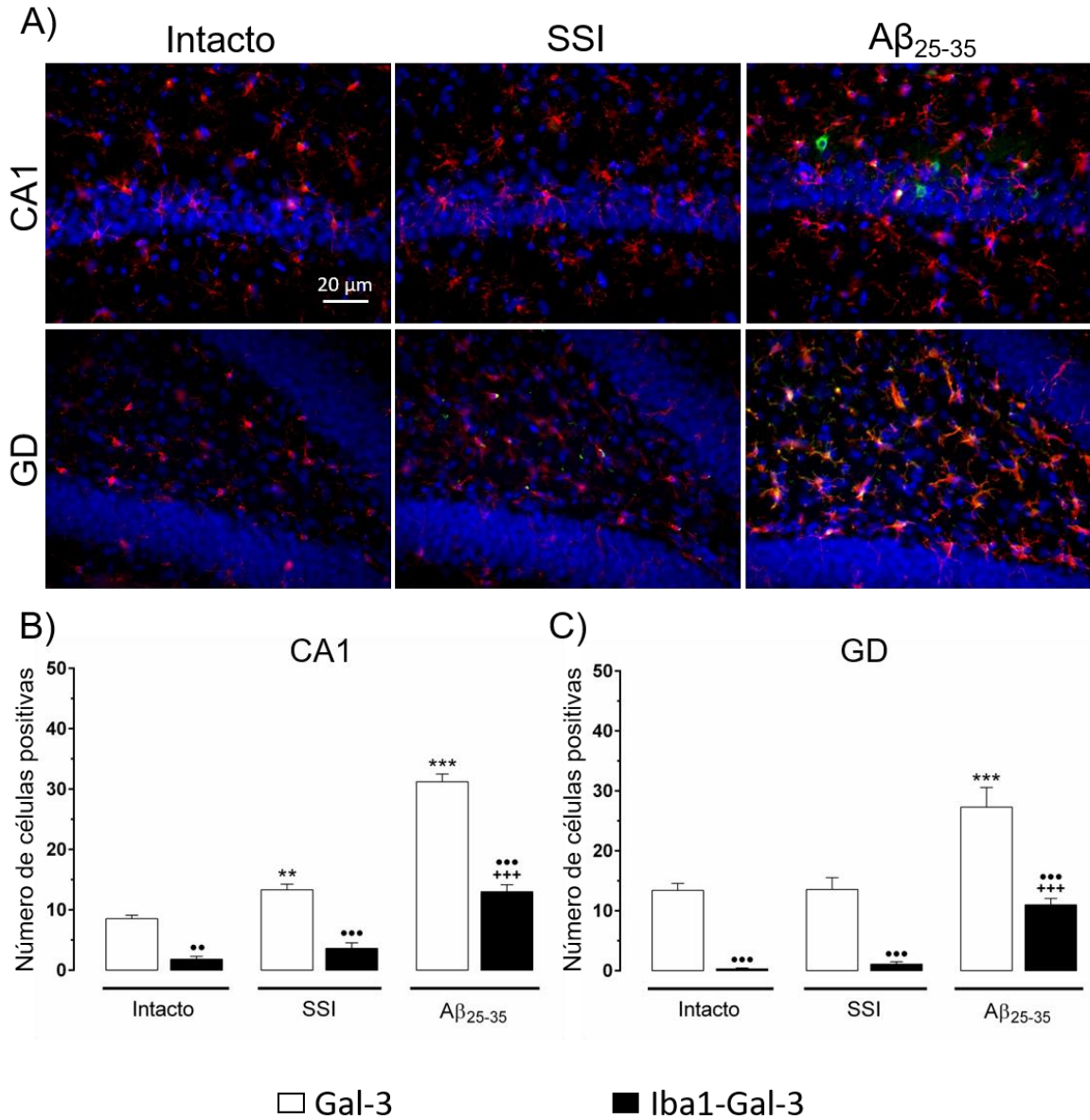


Figura 31. El péptido $A\beta_{25-35}$ incrementa la expresión de Gal-3 en células de la microglia en CA1 y DG. En A) se muestran las fotomicrografías de astrocitos (Iba1, rojo), Gal-3 (verde) y su colocalización (amarillo) al día 32. En B) se muestra el número de células positivas a Gal-3 y el número de células colocalizadas Iba1-Gal-3 en la región CA1 del hipocampo. En C) se muestra el número de células positivas a Gal-3 y el número de células colocalizadas Iba1-Gal-3 en GD. Los datos corresponden al promedio \pm EEM (ANOVA de una vía, post-test Bonferroni, Gal-1 ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; Iba1-Gal-1 *** $p < 0.001$; Gal-1 vs Iba1-Gal-1 ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

8. Discusión

Una de las principales características en la enfermedad de Alzheimer (EA) es la pérdida de la capacidad de formar y recuperar nuevas memorias. La disfunción cognitiva puede ocurrir en ausencia de degeneración neuronal, donde las sinapsis son las primeras estructuras afectadas por la exposición a la toxicidad de los oligómeros de amiloide- β ($A\beta$) (Walsh y Selkoe, 2004; Cleary y cols., 2005; Shankar y cols., 2007; Reddy y Beal, 2008; Reddy y cols., 2010; Freir y cols., 2011; Wisniewski y cols., 2011). Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos y la progresión de la neurodegeneración en los circuitos neuronales implicados en la formación de la memoria. Evidencias recientes han demostrado a la neuroinflamación como uno de los principales factores que contribuyen a la neurodegeneración en la EA (Amor y cols., 2010; Heneka y cols., 2015). A través de varias vías de señalización, la neuroinflamación contribuye a la activación de las células de la microglia y los astrocitos, que inducen la producción y liberación excesiva de citocinas y quimiocinas proinflamatorias que coadyuvan en la neurodegeneración (Glass y cols., 2010; Heneka y cols., 2014; Bronzuoli y cols., 2016). En el presente trabajo, empleamos al péptido $A\beta_{25-35}$ como un modelo de estudio de las etapas tempranas de la EA, para poder asociar el efecto del péptido $A\beta_{25-35}$ a los cambios morfológicos a nivel neuronal, en el proceso de neurogénesis y la neuroinflamación.

En el presente estudio se mostró un daño sobre la capacidad de evocación de la información adquirida en el LAM en los animales administrados con péptido $A\beta_{25-35}$ respecto a los grupos control. Nosotros observamos que el péptido $A\beta_{25-35}$ interfiere con la capacidad de evocación, asociado a una disminución en la longitud dendrítica y la densidad de espinas dendríticas en la región de GD. El daño generado presenta una tendencia a incrementar respecto al tiempo, donde se observa diferencias significativas al día 17 y 32. El almacenamiento de la información requiere de la plasticidad neuronal y la modificación en el número espinas dendríticas (Ramírez-Amaya y cols., 1999, 2001; Bailey y cols., 2004; Lamprecht y LeDoux, 2004; Frost y cols., 2010), así como la integración de nuevas neuronas (neurogénesis) (Dupret y cols., 2008). La consolidación de la memoria es

sensible a las interrupciones y su mantenimiento requiere la síntesis de proteínas para transformar la información recién adquirida en estructuras sinápticas estables. Se ha definido que una memoria recién formada se somete a un proceso de transformación, haciéndose más fuerte y más resistente con el tiempo hasta que es insensible a la interrupción (Abel y cols., 2001). Por lo tanto, es probable que la pérdida de función y daño a las sinapsis existentes pueda ser la razón de la alteración en la capacidad de evocación de la memoria. Se ha demostrado una relación entre el grado de lesión en el hipocampo y el bajo desempeño en las tareas de aprendizaje y memoria (Broadbent y cols., 2004).

Se ha demostrado que la administración del péptido $A\beta_{25-35}$ en regiones cerebrales como la CA1 del hipocampo o corteza temporal, genera daño sobre regiones con las que mantiene conexiones anatómicas (Limón y cols., 2009; Limón y cols., 2011; Díaz y cols., 2012). Esto se debe a sus propiedades neurotóxicas y la capacidad de migrar a otras regiones, donde induce daño progresivo (Jucker y Walker, 2013; Goedert, 2015). Por lo que el daño inducido por el péptido $A\beta_{25-35}$ compromete la estructura neuronal en el GD. El GD es la primera sinapsis de la vía tri-sináptica relacionada con el procesamiento de la información adquirida durante el aprendizaje para la formación de la memoria (Carasatorre y cols., 2016). La circunvolución del GD dorsal cumple tres procesos principales: 1) la codificación de las múltiples entradas sensoriales; 2) la separación del patrón espacial; 3) la facilitación de la codificación de la información espacial basada en las proyecciones sobre la región CA3, que están asociadas con las representaciones espaciales métricas (Amaral y Witter, 1989; Kesner, 2007; Kesner, 2013b). Un estudio reciente demostró que el rescate selectivo de la densidad de espinas dendríticas en células del engrama en el GD puede conducir a una recuperación de la memoria y puede ser una estrategia efectiva para tratar la pérdida de memoria en las primeras etapas de la EA (Roy y cols., 2016).

Las propiedades tóxicas del péptido $A\beta_{25-35}$ están mediadas por varios mecanismos que contribuyen al déficit cognitivo, al facilitar el daño a nivel sináptico (Lazcano y cols., 2014). El déficit cognitivo es causado por una disfunción sináptica que comienza antes de la pérdida neuronal severa (Selkoe, 2008). El daño a la

plasticidad sináptica y sus vías de proyección, de las sinapsis del hipocampo se ha identificado como la manifestación más temprana de un evento neurodegenerativo (Reddy y Beal, 2008). La neurodegeneración y la disfunción sináptica inducida por el péptido A β implica una sobreactivación del NMDAR que da lugar a un incremento de los niveles intracelulares de Ca²⁺_i, e inducción de la excitotoxicidad (Collingridge y cols., 2004; Nakazawa y cols., 2004; Alberini, 2005; Alberdi y cols., 2010; Ferreira y cols., 2012). Además, se ha demostrado que el péptido A β ₂₅₋₃₅ puede regular negativamente los receptores glutamatérgicos AMPA (GluR1) y NMDA a través de diversos mecanismos, como endocitosis y la reducción de la expresión de algunas subunidades (Carrillo-Mora y cols., 2014).

Los mecanismo de daño son la inducción de la activación de la vía del óxido nítrico (NO) (Keil y cols., 2004; Limón y cols., 2009), estrés oxidativo (Butterfield y cols., 2001; Carrillo-Mora y cols., 2014), peroxidación lipídica de membrana (Butterfield y cols., 2002; Gunn y cols., 2016), disfunción mitocondrial (Canevari y cols., 1999), alteraciones en la permeabilidad de la membrana (Lin y cols., 2001), excitotoxicidad (Esposito y cols., 2007; Parameshwaran y cols., 2008), colinotoxicidad (Patricio-Martínez y cols., 2016) e inflamación (Rosales-Corral y cols., 2004; Díaz y cols., 2012), que contribuyen a una lesión en el hipocampo dorsal. En nuestro experimento, las neuronas piramidales de la región CA1 y las células granulares de GD en la formación del hipocampo demuestran vulnerabilidad a la toxicidad del péptido A β ₂₅₋₃₅. El proceso neurodegenerativo inducido por el péptido A β ₂₅₋₃₅ se muestra en la región CA1 del hipocampo y del GD por una disminución del número de células positivas a NeuN al día 32. La reorganización de las redes cerebrales también desempeña un papel importante al permitir que las neuronas compensen la disfunción de las neuronas dañadas, y el objetivo final de estos procesos es la sustitución de las células disfuncionales por nuevas neuronas funcionales (Alberini y cols., 2006).

El proceso de aprendizaje requiere de la sinaptogénesis e integración de nuevas neuronas para la formación de la memoria (Dupret y cols., 2008; Lemaire y cols., 2012). Estas nuevas neuronas se originan a partir de células madre multipotentes (NSCs) que residen en la ZSG del GD. La integración de nuevas

neuronas en el GD participa en las funciones del hipocampo (Leuner y cols., 2004; Snyder y cols., 2005; Bruel-Jungerman y cols., 2006; Leuner y cols., 2006; Dupret y cols., 2007; Dupret y cols., 2008; Deng y cols., 2009; Lemaire y cols., 2012;). La neurogénesis es necesaria para la integración de la nueva información, ya que permiten separar, ordenar e integrar la información adquirida, para la formación de la memoria de largo plazo (Snyder y cols., 2005; Dupret y cols., 2008; Deng y cols., 2010; Aimone y cols., 2011). Los resultados del presente trabajo muestran una disminución del proceso de neurogénesis en la ZSG del GD (evidenciado por los marcadores BrdU y DCX) al día 32 posterior a la administración del péptido $A\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo. El péptido $A\beta_{25-35}$ induce un microambiente neurotóxico que promueve una disminución de los progenitores neuronales, y en consecuencia compromete la integridad y función de la formación del hipocampo. La proliferación celular en el GD fue cuantificada mediante la inmunohistoquímica contra BrdU, el cual fue incorporado al día 31 posterior a la administración del péptido $A\beta_{25-35}$. El BrdU es incorporado en los núcleos de las células en división (Snyder y cols., 2005). Los resultados muestran una disminución de las células positivas a BrdU en el GD en el grupo $A\beta_{25-35}$ respecto al grupo Intacto.

La marca a BrdU nos permitió evaluar la capacidad de proliferación celular ante un daño inducido por el péptido $A\beta_{25-35}$, sin embargo, es necesaria la evaluación de un segundo marcador que nos permita evidenciar la diferenciación neuronal en la ZSG son neuronas. Por esta razón, evaluamos la expresión de la proteína DCX (un marcador de diferenciación neuronal) que permite evaluar neuroblastos integrados en la región del GD. Durante la neurogénesis adulta, la expresión de DCX está presente en los neuroblastos y se regula por disminución concomitante a la aparición del marcador NeuN (Brown y cols., 2003; Couillard-Despres y cols., 2005; Snyder y cols., 2009). Los hallazgos de este trabajo sugieren que la proliferación y diferenciación podrían conducir a la estabilidad del circuito neuronal durante el aprendizaje. En este contexto, recientemente se ha propuesto que la producción de nuevas neuronas en el GD garantiza que durante el aprendizaje cada nuevo evento esté codificado de forma única y en consecuencia permita la separación de eventos o patrones similares (Leuner y cols., 2006;

Leutgeb y cols., 2007). Por lo tanto, el GD procesa, separa, codifica y representa la información espacial de múltiples entradas sensoriales, que comparten un cierto grado de similitud y, por lo tanto, reducen la interferencia espacial (Leutgeb y cols., 2007; Aimone y cols., 2011; Kesner 2013a; Carasatorre y cols., 2016).

El efecto del péptido $A\beta_{25-35}$ genera un microambiente neurotóxico que disminuye el proceso de neurogénesis. La disminución en el proceso de neurogénesis contribuye al déficit cognitivo evaluado en el LAM, lo cual podría interpretarse como un deterioro de la capacidad de separación, codificación e integración de patrones espaciales. La evidencia experimental obtenida en este estudio respalda la idea de un daño en los sustratos de la memoria, al determinar una disminución en la densidad de espinas dendríticas y la neurogénesis. En respuesta al aprendizaje espacial, el circuito hipocampal promueve cambios a nivel neuronal y proporciona la base estructural para la memoria a largo plazo. La información obtenida y almacenada en nuestra memoria está representada en el sistema nervioso central por la actividad coordinada de un grupo de neuronas que desarrollan la capacidad de repetir patrones de actividad adquiridos a través de la experiencia. La administración del péptido $A\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo afecta la memoria a través de cambios en la plasticidad neuronal y altera la proliferación celular y el número de neuronas que se integran al circuito neuronal.

El uso del péptido $A\beta_{25-35}$ en modelos animales ha permitido comprender la relación entre la inflamación y el daño en el aprendizaje y la memoria (Limón y cols., 2009; Limón y cols., 2011; Zussy y cols., 2011; Díaz y cols., 2012). El proceso de neuroinflamación se ha propuesto como factor negativo sobre la neurogénesis (Ben-Hur y cols., 2003; Cacci y cols., 2005; Liu y cols., 2005; Whitney y cols., 2009). En el presente trabajo se demostró que el péptido $A\beta_{25-35}$ causa la activación crónica de la microglia y de los astrocitos reactivos, lo que contribuye al daño neuronal en el hipocampo dorsal, mientras que el desequilibrio del proceso inflamatorio podría promover la muerte de las neuronas a largo plazo.

Las células de astrocitos y microglia responden al daño generado por el péptido $A\beta_{25-35}$. Las proteínas mal plegadas y agregadas favorecen la activación de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) en la microglia y la

astroglia, que desencadenan una respuesta inmune innata (Akira y Takeda, 2004). La respuesta inmune innata es coordinada inicialmente por los receptores de patrones de moléculas asociadas a patógenos (PAMPs) o de daño (DAMPs). Posteriormente se genera una respuesta inmune adaptativa específica, coordinada por síntesis de *novο* de los receptores a antígenos (Sofroniew, 2014, 2015). En la etapa inicial la microglia es capaz de unirse a los oligómeros y fibrillas de A β a través de receptores de la superficie celular, incluyendo los receptores SCARA1, CD36, CD14, α 6 β 1, CD47 y Toll (TLR2, TLR4, TLR6, Y TLR9). La unión de A β con CD36, TLR4 y TLR6 da lugar a la activación de la microglia, que comienza a producir citocinas proinflamatorias y quimiocinas (Amor y cols., 2010; Heneka y cols., 2014, 2015).

Los receptores TLR favorecen la activación del factor de transcripción NF- κ B, y en consecuencia una variedad de genes implicados en la respuesta inmunológica, que promueven la síntesis de TNF- α e IL-1 β (Block y cols., 2007; Heneka y cols., 2014). La activación de la microglia es un proceso complejo que resulta en varios fenotipos. El fenotipo clásico proinflamatorio (M1) está asociado a la expresión de citocinas proinflamatorias, incluyendo TNF α , IL-1, IL-6, IL-12 e IL-18, que está acompañada de un incremento en la capacidad fagocítica. El fenotipo de activación no inflamatoria (M2) se caracteriza por la secreción de citocinas antiinflamatorias, IL-4, IL-10, IL-13 y TGF- β , que aumenta la capacidad fagocítica (Cherry y cols., 2014). La microglia una vez activada es capaz de iniciar una cascada proinflamatoria que resulta en la liberación de moléculas como citocinas, proteínas del complemento, proteasas y otras proteínas de fase aguda.

Los astrocitos representan las células gliales más abundantes en condiciones fisiológicas, y cumplen importantes funciones dentro del SNC (Kirkley y cols., 2017). Proveen soporte físico y metabólico a las neuronas, participan en la formación y mantenimiento de la barrera hematoencefálica, producen factores neurotróficos, y participan en procesos de reparación dentro del SNC. La respuesta de los astrocitos es compleja y específica, que apunta a la neuroprotección y recuperación del tejido neuronal lesionado. Los astrocitos requieren la inducción de moléculas MHC clase

I y II por IFN- γ para la presentación de antígenos a células CD8⁺ o CD4⁺, respectivamente. Los astrocitos activos presentan características morfológicas y bioquímicas particulares de este proceso: hipertrofia celular, regulación positiva de los filamentos intermedios, y el aumento de la proliferación celular (Farina y cols., 2007).

La respuesta inflamatoria se caracteriza por la activación coordinada de varias vías de señalización que regulan la expresión de mediadores pro y antiinflamatorios (Vallabhapurapu y Karin, 2009). Las citocinas son reguladoras de la intensidad y duración del proceso inflamatorio, promoviendo la activación de diversas vías de señalización en respuesta al estrés celular (Rubio-Pérez y Morillas-Ruiz, 2012; Fuster-Matanzo y cols., 2013; Di Benedetto y cols., 2017). Por lo tanto, en esta investigación se utilizó la técnica de ELISA tipo sándwich para estudiar el papel de A β ₂₅₋₃₅ sobre la concentración de las citocinas IL-1 β , TNF- α e IFN- γ , que juegan un papel importante en la modulación de la neuroinflamación. Los resultados indican un incremento significativo en la concentración de estas citocinas en el hipocampo dorsal de los animales tratados con el péptido A β ₂₅₋₃₅ en comparación con el grupo control.

El incremento de las citocinas IL-1 β , TNF- α e IFN- γ están implicados en la regulación de la expresión de citocinas, factores solubles y elementos celulares que forman una compleja red de interacciones moleculares y celulares (Block y cols., 2007; Sofroniew y Vinters, 2010). Los eventos neurodegenerativos inducidos por el péptido A β ₂₅₋₃₅ se pueden explicar por la sobreactivación de astrocitos y microglia, y la secreción de diversas citocinas y quimiocinas (Zussy y cols., 2011; Díaz y cols., 2012). Sin embargo, el proceso de neuroinflamación y los eventos de neurodegeneración inducidos por el péptido A β ₂₅₋₃₅ aún no se comprenden completamente.

Se ha propuesto que la glicosilación de las proteínas de la superficie celular puede ser crítica en las interacciones proteína-glicano involucradas en la señalización celular que tiene lugar para la regulación de las respuestas innata y adaptativa (van Kooyk y Rabinovich, 2008; Rabinovich y cols., 2012). Existen

diferentes moléculas que modulan la respuesta de neuroinflamación, dentro de estas se encuentran las lectinas. La interacción lectina-glicano contribuye a la iniciación, ejecución y resolución de la neuroinflamación, desempeñando un papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis tisular y la respuesta a la lesión (Rudd y cols., 2001; Johnson y cols., 2013).

Las estructuras glicosídicas sirven, entre otras cosas, como reguladores dinámicos, que compiten con las modificaciones post-traduccionales de proteínas como la fosforilación, mientras que la variación estructural en los glicanos contribuye a la especialización y la diversidad biológica (Raman y cols., 2005; Alavi y Axford, 2008). Estas modificaciones co- y postraduccionales de O y N-glicanos en procesos inflamatorios son importantes para la reparación y regeneración del tejido neuronal (Johnson y cols., 2013). Es importante destacar que los cambios en los patrones de glicosilación se han asociado con diferentes enfermedades neurodegenerativas (Dube y Bertozzi, 2005; Alavi y Axford, 2008; Schedin-Weiss y cols., 2014; Kizuka y cols., 2017). La tarea de decodificar la información presente en los glicanos se asigna, en parte, a una gran variedad de proteínas o lectinas de unión a glicanos de mamíferos, que incluyen selectinas, pentraxinas, siglec y galectinas (Vasta y cols., 2012).

Las galectinas son una familia de proteínas de secuencia altamente conservada, con la capacidad de unión a glicanos. Se caracterizan por su capacidad de reconocer glicanos que contienen secuencias de N-acetil-lactosamina (Gal β 1,4GlcNAc), en los N- y O-glicanos de glicoconjugados presentes en la superficie celular (Hirabayashi y cols., 2002; Liu y cols., 2002; Yang y cols., 2008). Se ha propuesto a las galectinas como moduladores del proceso de neuroinflamación (Yang y cols., 2012), se consideran moduladores en la activación de astrocitos y microglia mediante el entrecruzamiento de glicoconjugados específicos (Starossom y cols., 2012). Los diferentes miembros de la familia de galectinas se comportan como agentes pro o antiinflamatorios, actuando a diferentes niveles de la respuesta inflamatoria aguda y crónica (Liu y Rabinovich, 2010; Liu y cols., 2012).

En este estudio se identificó al péptido $A\beta_{25-35}$ como inductor de neuroinflamación, a través de la activación de astrocitos y microglia al día 32, asociado a un incremento de Gal-3. Gal-1 y Gal-3 desempeñan un papel importante en la modulación de la inflamación, al participar en el reconocimiento de glicoconjugados de la superficie celular, que como muchos otros sistemas ligando-receptor, pueden desencadenar una cascada de eventos de señalización transmembranal (Yang y cols., 2008). A través de este mecanismo, las galectinas son capaces de modular una amplia variedad de procesos inmunológicos, incluida la apoptosis, la activación celular, la adhesión celular y la secreción de citocinas en astrocitos y microglia (Sirko y cols., 2015). En eventos neurodegenerativos la participación de las galectinas en la modulación de la respuesta inmunológica sigue siendo desconocida.

En el presente trabajo se demostró un incremento en la expresión y colocalización de Gal-3 en las células de la glía en el grupo $A\beta_{25-35}$, sin embargo, no hubo cambios significativos en la expresión de Gal-1 entre los grupos SSI y $A\beta_{25-35}$. La diferencia en la expresión de Gal-1 y Gal-3 está relacionada con la modulación de la respuesta inmune (Rabinovich y Toscano, 2009; Liu y Rabinovich, 2010; Toscano y cols., 2011). En el SNC, Gal-1 ejerce un efecto positivo en la inhibición de la microglia (Starossom y cols., 2012). Su expresión también está implicada en la regulación de la neurogénesis en la ZSG del GD y en la ZSV de los ventrículos. En su forma reducida ejerce un efecto positivo sobre la diferenciación e interacción célula-célula (Imaizumi y cols., 2011; Sakaguchi y cols., 2006). La expresión de Gal-3 se ha asociado a la modulación dual de la respuesta inflamatoria (Dhirapong y cols., 2009; Houg y cols., 2011). Un reciente estudio sugiere a Gal-3 como un desencadenante en la activación de la microglia y astrocitos en el incremento de la respuesta inflamatoria ante un evento crónico que puede modular la respuesta inmune adaptativa (Jeon y cols., 2010). Gal-3 es expresada por microglia y cumple una función en la amplificación de la respuesta inmune, actuando como un ligando al receptor TLR4 (Burguillos y cols., 2015).

El equilibrio entre las propiedades antiinflamatorias y proinflamatorias de las galectinas podría modular la neuroinflamación inducida por el péptido $A\beta_{25-35}$ y su

estrecha relación con la neurodegeneración. Comprender las interacciones dentro del sistema nervioso entre Gal-1, Gal-3 y el sistema inmune, podría ser la clave para prevenir o retrasar la neurodegeneración. En el presente trabajo se mostró un incremento en la expresión de Gal-1 en astrocitos y microglia. La expresión de Gal-1 en la formación del hipocampo mostró un tropismo principalmente por las células de la microglia, sin embargo, no presenta cambios significativos entre los grupos experimentales. Por lo tanto, se propone que ante un daño inducido por el péptido A β ₂₅₋₃₅, la expresión de Gal-1 podría estar asociada con una respuesta antiinflamatoria; sin embargo, el efecto del péptido A β ₂₅₋₃₅ mantiene la sobreactivación de las células gliales.

La Gal-1 actúa como un regulador negativo de la respuesta inflamatoria (Starossom y cols., 2012), los astrocitos reaccionan ante una lesión cerebral y responden mediante la liberación de factores propios del proceso de neuroinflamación (Sofroniew y cols., 2010). Se ha demostrado que Gal-1 cumple diferentes funciones *in vivo*, tales como la promoción de apoptosis en células Th1 (Linfocitos T cooperadores), la inducción de la expresión de IL-10 y la regulación negativa de citocinas proinflamatorias, que dan como resultado la limitación de la respuesta inmune (Toscano y cols., 2006, 2011). En la primera fase de la respuesta inmune, la expresión de Gal-1 induce la diferenciación de astrocitos y modula su proliferación. Gal-1 en astrocitos diferenciados induce la expresión del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) (Sasaki y cols., 2004). Los astrocitos que experimentan una respuesta reactiva son neuroprotectores bajo ciertas condiciones, mientras que la astrogliosis excesiva es perjudicial y contribuye al daño neuronal (Farina y cols., 2007; Sofroniew y cols., 2010). Las interacciones Gal-1-glicano contribuyen a la neuroprotección mediante la desactivación de la microglia, y su diferenciación a un fenotipo M2 mediante la modulación de la proteína quinasa activada por mitógeno p38 (p38MAPK), la unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB) y la vía de señalización de NF- κ B (Starossom y cols., 2012).

Las vías de señalización de las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β , o los receptores Toll-like (TLR), desencadenan la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) (Li y

cols., 2004). La vía NF- κ B juega un papel central en la inflamación y activación de la respuesta inmune adaptativa a través de la expresión de genes diana de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y moléculas de adhesión celular (Pasparakis, 2009). La vía del NF- κ B regula la expresión de Gal-1, una proteína de unión a glicano endógena con actividad antiinflamatoria (Toscano y cols., 2006; Barrionuevo y cols., 2007; Norling y cols., 2008; Lawrence, 2009; Toscano y cols., 2011).

Durante la neuroinflamación, IFN- γ induce un fenotipo M1 en células microgliales, que se caracteriza por altos niveles del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II), CD86 y expresión de la iNOS de una manera dependiente de STAT1, así como la producción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas, tales como TNF- α y CCL2 (Butovsky y cols., 2006; Kawanokuchi y cols., 2008). La ruta del IFN- γ activa predominantemente a Janus-cinasas transductores de la señal y activadores de la transcripción (JAK/STAT). De los siete miembros de la familia STAT, STAT1 es el principal efector río abajo de IFN- γ . La fosforilación de STAT1 por JAK, favorece la homodimerización de STAT1 y la translocación al núcleo, donde inicia la transcripción de genes estimulados por IFN- γ . Recientemente se demostró que Gal-3 aumenta su expresión y secreción en astrocitos y microglía en respuesta a IFN- γ (Jeon y cols., 2010), lo que sugiere que Gal-3 ejerce un efecto de modulación en la respuesta inflamatoria a nivel cerebral (Yang y cols., 2012).

Se observó un incremento en la expresión de Gal-3 en astrocitos (GFAP) y microglía (Iba1) en la formación del hipocampo después del daño inducido por el péptido A β ₂₅₋₃₅ al día 32. La expresión de Gal-3 es regulada positivamente por la microglía activada que contribuye a la fagocitosis y a los astrocitos les confiere fuertes propiedades quimiotácticas en procesos inflamatorios (Walther y cols., 2000; Yan y cols., 2009). Gal-3 se puede encontrar en citoplasma, núcleo y membranas (Shimura y cols., 2004) y su expresión aumenta en las células gliales implicadas en la respuesta inflamatoria (Sato y cols., 2011a, b; Lalancette-Herbert y cols., 2012; Wesley y cols., 2013). Las diferentes localizaciones subcelulares de Gal-3 y la dinámica de las modificaciones glicosídicas pueden modificar la respuesta de Gal-3 como el pro- *versus* anti-apoptótico (Nakahara y cols., 2005) y el pro- *versus*

antiinflamatorio (Liu y cols., 2002; MacKinnon y cols., 2008; Jeon y cols., 2010). Un estudio reciente demostró que Gal-3 desencadena la activación de la microglia y de los astrocitos mediante la activación de la vía de señalización JAK-STAT (Jeon y cols., 2010). Además, se ha sugerido que Gal-3 muestra propiedades similares a las citocinas, que regulan las respuestas inmunes e inflamatorias en el cerebro (Li y cols., 2008; Dhirapong y cols., 2009; Henderson y Sethi, 2009).

Se ha demostrado que el tratamiento con Gal-3 en cultivos primarios de microglía y astrocitos aumentó notablemente la expresión de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IFN- γ), pero no alteró la expresión de mediadores antiinflamatorios (por ejemplo, el factor de crecimiento transformante- β e IL-10) (Jiang y cols., 2009; Radosavljevic y cols., 2012; Shin, 2013). Por otra parte, Gal-3 está involucrada en la respuesta proinflamatoria desencadenada por algunos receptores microgliales (Boza-Serrano y cols., 2014). Recientemente se ha demostrado la interacción Gal-3-TLR-4 que contribuye a la actividad de microglia en la respuesta de neuroinflamación (Burguillos y cols., 2015). El incremento en la expresión de Gal-3 en el modelo del péptido A β ₂₅₋₃₅ nos permite proponer que pudiera contribuir a largo plazo en la neurodegeneración asociada a la neuroinflamación.

Nuestro grupo de trabajo demostró que el péptido A β ₂₅₋₃₅ induce cambios glucosídicos, principalmente sobre los patrones de sialilación, que se asocia con un proceso de respuesta a la neurodegeneración. Se observó un incremento de ácido siálico en unión α -2,6 sobre la forma de ácido siálico en unión α -2,3 ante el efecto neurotóxico del péptido A β ₂₅₋₃₅ (Limón y cols., 2011). La afinidad que presenta cada miembro de la familia de las galectina por sus ligandos está limitada o varía dependiendo de la sustitución que tiene el β -galactósido central, que resulta en diferencias sutiles, pero significativas para el CRD de la galectina (Sato y cols., 2009; Vasta y cols., 2012). La modificación de los residuos de la galactosa (Gal) unido al β -galactósido por α -N-acetilgalactosamina (GalNAc) disminuye significativamente la afinidad de Gal-1 por este residuo, e incrementa la afinidad de Gal-3. Alternativamente, la modificación por ácidos siálicos en uniones α 2-6, pero no el ácido siálico en unión α 2-3, reduce la afinidad de Gal-1, sin embargo, no

modifica el reconocimiento de Gal-3 (Hirabayashi y cols., 2002; Stowell y cols., 2008; Sato y cols., 2009).

En conclusión, se propone a la neuroinflamación como uno de los principales mecanismos de daño del péptido A β ₂₅₋₃₅, que induce daño a nivel de los diferentes sustratos necesarios para la formación y evocación de la memoria. La neuroinflamación requiere de una señalización exacta, la cual es mediada por citocinas como IL-1 β , TNF- α e IFN- γ que inducen y regulan la respuesta inmune adaptativa. Las galectinas participan en la activación y modulación a nivel de las células de los astrocitos y la microglía. El incremento de Gal-3 y la disminución de Gal-1 están asociados a la diferenciación de la microglía de fenotipo M1 y una actividad mayor de los astrocitos. Nuestro trabajo nos permite proponer a la neuroinflamación como uno de los principales mecanismos implicados en el daño sobre los circuitos neuronales del hipocampo en el modelo de A β ₂₅₋₃₅, sin embargo, aún restan preguntas por responder.

9. Esquema hipotético

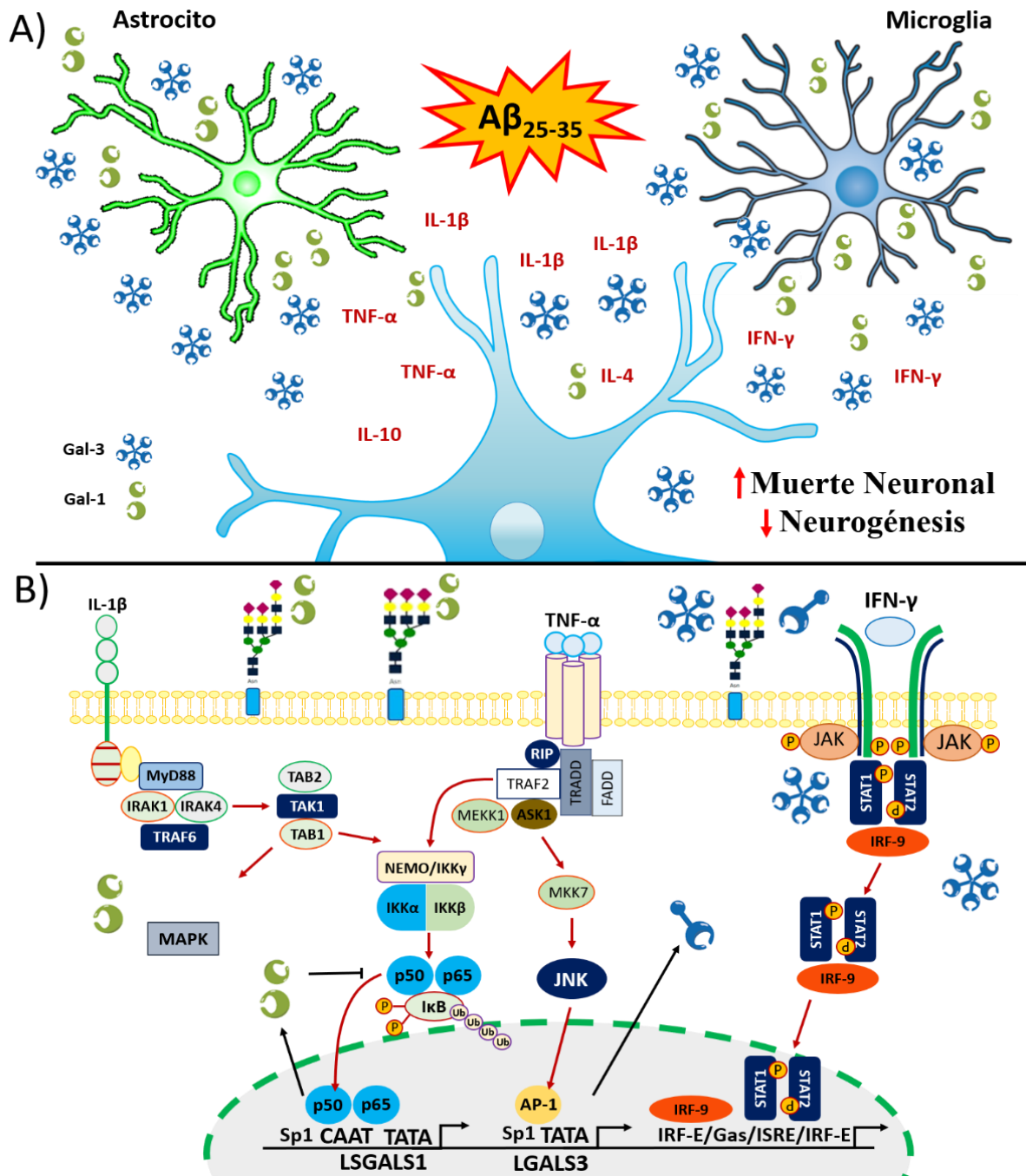


Figura 32. La administración del péptido Aβ₂₅₋₃₅ induce un proceso de neuroinflamación que genera un daño neuronal. En A) se muestra que la administración del péptido Aβ₂₅₋₃₅ induce un proceso de neuroinflamación, la que genera un incremento de citocinas proinflamatorias. Se inducen la expresión de Gal-3 y Gal-1 que cumplen una función en la modulación de la respuesta de astrocitos y microglia. En B) se muestra que las citocinas IL-1β, TNF-α e IFN-γ modulan la respuesta de neuroinflamación y la expresión de factores proinflamatorios, Gal-1 y Gal-3.

10. Conclusión

Los hallazgos abren un nuevo panorama relacionado con el déficit cognitivo inducido por la administración del péptido $A\beta_{25-35}$ en la región CA1 del hipocampo. Nuestros resultados muestran que el efecto neurotóxico de $A\beta_{25-35}$ induce una disminución en la longitud dendrítica y número de espinas dendríticas y el proceso de neurogénesis en la región de GD, que está asociado con la pérdida en la capacidad de recuperación de la información aprendida en el LAM. Esto a través de un incremento en la neuroinflamación asociada a la actividad de los astrocitos y la microglia para inducir la secreción de citocinas proinflamatorias y la expresión de Galectina-1 y Galectina-3. La expresión de galectinas se encuentra colocalizada en las células de los astrocitos y la microglia, lo que sugiere su participación en la modulación de la respuesta de neuroinflamación.

11. Perspectivas

1. Estudiar el efecto de la expresión de Galectina-1 en el modelo del péptido $A\beta_{25-35}$ sobre el proceso de neurogénesis en el giro dentado.
2. Estudiar el efecto de la expresión de Galectina-1 en el modelo del péptido $A\beta_{25-35}$ sobre la activación de la microglia, los astrocitos y citocinas proinflamatorias en la formación del hipocampo.
3. Estudiar el efecto de la inhibición de $TNF-\alpha$ en el modelo del péptido $A\beta_{25-35}$ sobre la expresión de Galectina-1, Galectina-3 y los cambios en las estructuras glicosídicas en el hipocampo y giro dentado.

12. Bibliografía

A

- Abel, T., Lattal, K.M. 2001. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11: 180-187.
- Abraham, W.C., Robins, A. 2005. Memory retention – the synaptic stability versus plasticity dilemma. *Trends Neurosci.* 28(2): 73-78.
- Aimone, J.B., Deng, W., Gage, F.H. 2010. Adult neurogenesis: integrating theories and separating functions. *Trends. Cogn. Sci.* 14(7): 325-337.
- Aimone, J.B., Deng, W., Gage, F.H. 2011. Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. *Neuron.* 70: 589-596.
- Akira, S., Takeda, K. 2004. Toll-like receptor signaling. *Nat. Rev. Immunol.* 4(7): 499-511.
- Alavi, A., Axford J.S. 2008. Sweet and sour: the impact of sugars on disease. *Rheumatology.* 47(6): 760-70.
- Alberini, C.M. 2005. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends. Neurosci.* 28: 51-56.
- Alberini, C.M., Milekic, M.H., Tronel, S. 2006. Mechanism of memory stabilization and de-stabilization. *Cell. Mol. Life. Sci.* 63: 999-1008.
- Alberdi, E., Sánchez-Gómez, V., Cavaliere, F., Pérez-Samartín, A., Zugaza, J.L., Trullas, R., Domercq, M., Matute, C. 2010. Amyloid β oligomers induce Ca^{2+} dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptor. *Cell Calcium.* 47: 264-272.
- Almkvist, J., Karlsson, A. 2002. Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj J.* 19(7-9): 575-81.
- Altman, J., Das, G.D. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 124(3): 319-335.
- Alvarez-Buylla, A., García-Verdugo, J.M. 2002. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J. Neurosci.* 22(3): 629-634.
- Amaral, D.G., Witter, M.P. 1989. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience.* 31: 571-591.

- Amaral, D., Lavenex, P. 2007. *Hippocampal neuroanatomy*, en, *The hippocampus Book*, ed, P. Andersen, R. Morris, D. Amaral, D.T. Bliss, J. O'Keefe (New York: Oxford University Press), 37-114.
- Amor, S., Puentes, F., Baker, D., van der Valk, P. 2010. Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology*. 129(2): 154-169.
- Andersen, P., Blackstad, T.W. Lomo, T. 1996a. Location and identification of excitatory synapses on hippocampal pyramidal cells. *Exp. Brain Res.* 1: 236-248.
- Andersen, P., Holmqvist, B., Voorhoeve, P.E. 1996b. Entorhinal activation of dentate granule cells. *Acta Physiol. Scand.* 66: 448-460.
- Arshavsky, Y.I. 2006. "The seven sins" of the Hebbian synapse: Can the hypothesis of synaptic plasticity explain long-term memory consolidation? *Prog. Neurobiol.* 80(3): 99-113.
- Avila-Muñoz, E., Arias, C. 2014. When astrocytes become harmful: functional and inflammatory response that contribute to Alzheimer's disease. *Ageing Res. Rev.* 18: 29-40.

B

- Bailey, C.H., Kandel, E.R., Si, K. 2004. The persistence of long-term memory: a molecular approach to self-sustaining changes in learning-induced synaptic growth. *Neuron*. 44: 49-57.
- Balu, D.T., Lucki, I. 2009. Adult hippocampal neurogenesis: Regulation, functional implications, and contribution to pathology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 33: 232-252.
- Barco, A., Craig, H., Kandel, R. 2006. Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. *J. Neurochem.* 97: 1520-1533.
- Barrionuevo, P., Beigier-Bompadre, M., Ilarregui, J.M., Toscano, M.A., Bianco, G.A., Isturiz, M.A., Rabinovich, G.A. 2007. A novel function for galectin-1 at the crossroad of innate and adaptive immunity: galectin-1 regulates monocyte/macrophage physiology through a nonapoptotic ERK-dependent pathway. *J. Immunol.* 178: 436-445.
- Bastos., G.N., Moriya, T., Inui, F., Katura, T., Nakahata, N. 2008. Involvement of cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-induced impairment of the newborn cell. *Neuroscience*. 155(2): 454-462.
- Battista, D., Rutishauser, U. 2010. Removal of polysialic acid triggers dispersion of subventricularly derived neuroblasts into surrounding CNS tissues. *J. Neurosci.* 30: 3995-4003.

- Ben-Hur, T., Ben-Menachem, O., Furer, V., Einstein, O., Mizrachi-Kol, R., Grigoriadis, N. 2003. Effects of proinflammatory cytokines on the growth, fate, and motility of multipotential neural precursor cells. *Mol. Cell Neurosci.* 24: 623–631.
- Ben-Yakov, A., Dudai, Y., Mayford, M.R. 2015. Memory retrieval in mice and men. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7(12): a021790.
- Bezaire, M. J., Soltesz, I. 2013. Quantitative assessment of CA1 local circuits: knowledge base for interneuron-pyramidal cell connectivity. *Hippocampus.* 23: 751-785.
- Blennow, K., de Leon, M.J., Zetterberg, H. 2006. Alzheimer's disease. *Lancet.* 368(9533): 387-403.
- Block, M.L., Zecca, L., Houg, J.S. 2007. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.* 8(1): 57-69.
- Bourne, J., Harris, K.M. 2007. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? *Curr. Opin. Neurobiol.* 17(3): 381-386.
- Boza-Serrano, A., Reyes, J.F., Rey, N.L., Leffler, H., Bousset, L., Nilsson, U., Brundin, P., Venero, J.L., Burguillos, M.A., Deierborg, T. 2014. The role of galectin-3 in α -synuclein-induced microglia activation. *Acta Neuropathol. Commun.* 2: 156.
- Broadbent, N.J., Squire, L.R., Clark, R.E. 2004. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101(40): 14515-14520.
- Bronzuoli, M.R., Lacomino, A., Steardo, L. 2016. Targeting neuroinflammation in Alzheimer's disease. *J. Inflamm. Res.* 9: 199-208.
- Brown, J.P., Couillard-Després, S., Cooper-Kuhn, C.M., Winkler, J., Aigner, L., Kuhn, G.H., 2003. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* 467(1): 1-10.
- Bruel-Jungerman, E., Davis, S., Rampon, C., Laroche, S. 2006. Long-term potentiation enhances neurogenesis in the adult dentate gyrus. *J. Neurosci.* 26: 5888-5893.
- Burguillos, M.A., Svensson, M., Schulte, T., Boza-Serrano, A., Garcia-Quintanilla, A., Kavanagh, E., Santiago, M., Viceconte, N., Oliva-Martin, M.J., Osman, A.M., Salomonsson, E., Amar, L., Persson, A., Blomgren, K., Achour, A., Englund, E., Leffler, H., Venero, J.L., Joseph, B., Deierborg, T. 2015. Microglia-Secreted Galectin-3 Acts as a Toll-like Receptor 4 Ligand and Contributes to Microglial Activation. *Cell Rep.* S2211-1247(15)00140-0.

- Butovsky, O., Ziv, Y., Schwartz, A., Landa, G., Talpalar, A.E., Pluchino, S., Martino, G., Schwartz, M. 2006. Microglia activated by IL-4 or IFN- γ differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 31: 149-160.
- Butterfield, D.A., Castegna, A., Lauderback, C.M., Drake, J., 2002. Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol. Aging.* 23(5): 655-664.
- Butterfield, D.A., Drake, J., Pocernich, C., Castegna, A., 2001. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid β -peptide. *Trends Mol. Med.* 7(12): 548-554.

C

- Cacci, E., Claassen, J.H., Kokaia, Z. 2005. Microglia-derived tumor necrosis factor- α exaggerates death of newborn hippocampal progenitor cells in vitro. *J. Neurosci Res.* 80: 789–797.
- Camby, I., Le Mercier, M., Lefranc, F., Kiss, R. 2006. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology.* 16(11): 137R-157R.
- Canevari, L., Clark, J.B., Bates, T.E. 1999. β -Amyloid fragment 25-35 selectively decreases complex IV activity in isolated mitochondria. *FEBS Lett.* 457: 131-134.
- Carasatorre, M., Ramírez-Amaya, V., Díaz-Cintra, S. 2016. Structural synaptic plasticity in the hippocampus induced by spatial experience and its implications in information processing. *Neurologia.* 31(8): 543-549.
- Carrillo-Mora, P., Luna, R., Colín-Barenque, L. 2014. Amyloid beta: multiple mechanisms of toxicity and only some protective effects? *Oxid. Med. Cell. Longev.* 795375.
- Chacko, B.K., Scott, D.W., Chandler, R.T., Patel, R.P. 2011. Endothelial surface N-glycans mediate monocyte adhesion and are targets for anti-inflammatory effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands. *J. Biol. Chem.* 4: 38738-47.
- Chen, X., Garelick, M.G., Wang, H., Lil, V., Athos, J., Storm, D.R. 2005. PI3 kinase signaling is required and extinction of contextual memory. *Nat. Neurosci.* 8: 925-931.
- Cherry, J.D., Olschowka, J.A., O'Banion, M.K. 2014. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J. Neuroinflammation.* 11: 98.
- Chiaramello, S., Dalmaso, G., Bezin, L., Marcel, D., Jourdan, F., Peretto, P., Fasolo, A., De Marchis, S. 2007. BDNF/TrkB interaction regulates migration of SVZ

precursor cells via P13-K and MAP-K signaling pathway. *Eur. J. Neurosci.* 26: 1780-1790.

- Chiriani, A., Whitfield, J., Bonafini, C., Chakravarthy, B., Armato, U., Dal Pra, I. 2010. Amyloid- β (25-35), an amyloid- β (1-42) surrogate, and proinflammatory cytokines stimulate VEGF-A secretory by culture, early passage, normoxic adult human cerebral astrocytes. *J. Alzheimer Dis.* 21(3): 915-926.
- Chun, S.K., Sun, W., Park, J.J., Jung, M.W. 2006. Enhanced proliferation of progenitor cells following long-term potentiation induction in the rat dentate gyrus. *Neurobiol. Learn. Mem.* 86: 322-329.
- Cingolani, L.A., Goda, Y. 2008. Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nat. Rev. Neurosci.* 9(5): 344-356.
- Cleary, J.P., Walsh, D.M., Hofmeister, J., Shankar, G.M., Kuskowski, M.A., Selkoe, D.J., Ashe, K.H., 2005. Natural oligomers of the amyloid- β protein specifically disrupt cognitive function. *Nat. Neurosci.* 8(1): 79-84.
- Clelland, C.D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson, G.D., Fragniere, A., Tyers, P., Jessberger, S., Saksida, L.M., Barker, R.A., Gage, F.H., Bussey, T.J. 2009. A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science.* 325: 210-213.
- Collingridge, G.L., Isaac, J.T.R., Wang, Y.T. 2004. Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 5(12): 952-962.
- Coulliard-Despres, S., Winner, B., Schaubeck, S., Aigner, R., Vroemen, M., Weidner, N., Bogdahn, U., Winkler, J., Kuhn, H.G., Aigner, L. 2005. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.* 21(1): 1-14.

D

- Dash, P.K., Hebert, A.E., Runyan, J.D. 2004. A unified theory for systems and cellular memory consolidation. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 45(1): 30-7.
- De Felice, F.G., Velasco, P.T., Lambert, M.P., Viola, K., Fernandez, S.J., Ferreira, S.T., Klein, W.L. 2007. Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-Methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J. Biol. Chem.* 282(15): 11590-11601.
- Deng, W., Aimone, J.B., Gage, F.H. 2010. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat. Rev. Neurosci.* 11(5): 339-350.

- Deng, W., Saxe, M.D., Gallina, I.S., Gage, F.H. 2009. Adult-born hippocampal granule cells undergoing maturation modulate learning and memory in the brain. *J. Neurosci.* 43: 13532-15542.
- Dhirapong, A., Lleo, A., Leung, P., Gershwin., M.E., Liu, F.T. 2009. The immunological potential of galectin-1 and -3. *Autoimmun. Rev.* 8(5): 360-363.
- Di Benedetto, S., Müller, L., Wenger, E., Düzel, S., Pawelec, G. 2017. Contribution of neuroinflammation and immunity to brain aging and the mitigating effects of physical and cognitive interventions. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 75: 114-128.
- Di Lella, S., Sundblad, V., Cerliani, J.P., Guardia, C.M., Estrin, D.A., Vasta, G.R., Rabinovich, G.A. 2011. When galectins recognize glycans: from biochemistry to physiology and back again. *Biochemistry.* 50(37): 7842-57.
- Díaz, A., Mendieta, L., Zenteno, E., Guevara, J., Limón, I.D., 2011. The role of NOS in the impairment of spatial memory and damage neurons in rats injected with amyloid beta 25-35 into temporal cortex. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 98(1): 67-75.
- Díaz, A., Limón, D., Chávez, R., Zenteno, E., Guevara, J., 2012. A β_{25-35} injection into the temporal cortex induces chronic inflammation that contributes to neurodegeneration and spatial memory impairment in rats. *J. Alzheimers Dis.* 30(3): 505-522.
- Doody, R.S., Ramman R., Farlow, M., Iwatsubo, T., Vellas, B., Joffe, S., et al., 2013 A phase 3 trials of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 369: 341-350.
- Dube, D.H., Bertozzi, C.R. 2005. Glycans in cancer and inflammation-potential for therapeutics and diagnostics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4(6): 477-88.
- Duce, J.A., Tsatsanis, A., Carter, M.A., James, S.A., Robb, E., Wikhe, K., Leong, S.L., Perez, K., Johanssen, T., Greenough, M.A., Cho, H.H., Galatis, D., Moir, R.D., Masters, C.L., McLean, C., Tanzi, R.E., Cappai, R., Barnham, K.J., Ciccotosto, G.D., Rogers, J.T., Bush, A.I. 2010. Iron-export ferroxidase activity of β -amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease. *Cell.* 142(6): 857-867.
- Dudai, Y., Karni, A., Born, J. 2015. The consolidation and transformation of memory. *Neuron.* 88(1): 20-32.
- Dupret, D., Fabre, A., Döbrössy, M.D., Panatier, A., Rodriguez, J.J., Lamarque, S., Lemaire, V., Olier, S.H., Piazza, P.V., Abrous, D.N., 2007. Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *Plos Biol.* 5(8): e214.

- Dupret, D., Revest, J.M., Koehl, M., Ichas, F., De Giorgi, F., Costet, P., Abrous, D.N., Piazza, P.V. 2008. Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *Plos one*. 3(4): e1959.

E

- Eikelenboom, P., van Gool W.A. 2004. Neuroinflammatory perspective on the two faces of Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm.* 111(3): 281-294.
- Ekdahl, C.T., Claassen, J.H., Bonde, S., Kokaia, Z., Lindvall, O. 2003. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 13632-13637.
- Elola, M.T., Chiesa, M.E., Alberti, A.F., Mordoh, J., Fink, N.E. 2005. Galectin-1 receptor in different cells types. *J Biomed. Sci.* 12(1): 13-29.
- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., Gage, F.H. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 4(11): 1313-1317.
- Esposito, M.S., Piatti, V.C., Laplagne, D.A., Morgensten, N.A., Ferrari, C.C., Pitossi, F.J., Schinder, A.F. 2005. Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J. Neurosci.* 25(44): 10074-10086.
- Esposito, Z., Belli, L., Toniolo, S., Sancesario, G., Bianconi, C., Martorana, A., 2007. Amyloid β , glutamate, excitotoxicity in Alzheimer's Disease: Are we on the right track? *CNS Neurosci. Ther.* 19(8): 549-555.

F

- Farina, C., Aloisi, F., Meinl, E. 2007. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *TRENDS Immunol.* 28(3): 138-145.
- Federman, N., Zalcman, G., de la Fuente, V., Fustiñana, M.S., Romano, A. 2014. Epigenetic mechanism and memory strength: A comparative study. *J. Physiol. Paris.* 108(4-6): 278-285.
- Fernández-Vizarra, P., Fernández, A.P., Castro-Blanco, S., Encinas, J.M., Serrano, J., Bentura, M.L., Muñoz, P., Martínez-Murillo, R., Rodrigo, J. 2004. Expression of nitric oxide system in clinically evaluated cases of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 15(2): 287-305.
- Ferreira I.L., Bajouco, L.M., Mota, S.I., Auberson, Y.P., Oliveira, C.R., Rego, A.C., 2012. Amyloid beta peptide 1-42 disturbs intracellular calcium homeostasis through

activation of GluN2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors in cortical cultures. *Cell Calcium*. 51(2): 95-106.

- Filippov, V., Kronenberg, G., Pivneva, T., Reuter, K., Steiner, B., Wang, L.P., Yamaguchi, M., Kettenmann, H., Kempermann, G. 2003. Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol. Cell Neurosci*. 23(3): 373-82.
- Freir, D.B., Fedriani, R., Scully, D., Smith, I.M., Selkoe, D.J., Walsh, D.M., Regan, C.M., 2011. A β oligomers inhibit synapse remodeling necessary for memory consolidation. *Neurobiol. Aging*. 32(12): 2211-2218.
- Frost, N.A., Shroff, H., Kong, H., Betzig, E., Blanpied, T.A. 2010. Single-molecule discrimination of discrete presynaptic and distributed sites of actin filament assembly within dendritic spines. *Neuron*. 67: 86-99.
- Frotscher, M., Seress, L. 2007. Morphological development of the hippocampus. En: *The hippocampus book*. Oxford University Press. 115-133.
- Fukuda, S., Kato, F., Tozuka, Y., Yamaguchi, M., Miyamoto, Y., Hisatsune, T. 2003. Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J. Neurosci*. 23(28): 9357-9366.
- Fuster-Matanzo, A., Llorens-Martín, M., Hernández, F., Avila, J. 2013. Role of neuroinflammation in adult neurogenesis and Alzheimer disease: therapeutic approaches. *Mediators Inflamm*. 2013: 260925.

G

- Gabius, H.J., Roth, J. 2017. An introduction to the sugar code. *Histochem. Cell Biol*. 147: 111-117.
- Gage, F.H. 2002. Neurogenesis in the adult brain. *J. Neurosci*. 22(3): 612-613.
- Ge, S., Sailor, K.A., Ming, G., Song, H. 2008. Synaptic integration and plasticity of new neurons in the hippocampus. *J. Physiol*. 586: 3759-3765.
- Gibb, R., Kolb, B. A., 1998. method for vibratome section of Golgi-Cox stained whole rat brain. *J. Neurosci. Meth*. 79: 1-4.
- Glass, C.K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M.C., Gage, F.H. 2010. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*. 140(6): 918-934.

- Glenner, G.G., Wong, C.W. 2012. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425(3): 534-539.
- Goedert, M. 2015. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled A β , tau, and α -synuclein. *Science.* 349(6248): 1255555.
- Gold, A.E., Kesner, R.P., 2005. The role of the CA3 subregion of the dorsal hippocampus in spatial pattern completion in the rat. *Hippocampus.* 15: 808-814.
- Govindarajan, A., Israely, I., Huang, S.Y., Tonegawa, S. 2011. The dendritic branch is the preferred integrative unit for protein synthesis-dependent LTP. *Neuron.* 69(1): 132-146.
- Graciuc, A., Serrano-Pozo, A., Parrado, A.R., Lesinski, A.N., Asselin, C.N., Mullin, K., Hooli, B., Choi, S.H., Hyman, B.T., Tanzi, R.E. 2013. Alzheimer's disease risk gene CD33 inhibits microglial uptake of amyloid beta. *Neuron.* 78(4): 631-643.
- Griffin, W.S., Barger, S.W. 2010. Neuroinflammatory cytokines-The common thread in Alzheimer's Pathogenesis. *US. Neurol.* 6(2): 19-27.
- Gruden, M.A., Davidova, T.B., Malisaukas, M., Sewell, R.D., Voskresenskaya, N.I., Wilhelm, K., Elistratova, E.I., Sherstnev, V.V., Morozova-Roche, L.A. 2007. Differential neuroimmune markers to the onset of Alzheimer's disease neurodegenerative and dementia: autoantibodies to Abeta ((25-35)) oligomers, S100b and neurotransmitters. *J. Neuroimmunol.* 186(1-2): 181-192.
- Guan J.S., Xie, H., Ding, X. 2015. The role of epigenetic regulation in learning and memory. *Exp. Neurol.* 268: 30-6.
- Guénette, S.Y. 2003. Astrocytes: a cellular player in Abeta clearance and degradation. *Trends Mol. Med.* 9(7): 279-280.
- Gulyaeva, N.V., Stepanichev, M.Y. 2010. Abeta(25-35) as proxyholder for amyloidogenic peptides: in vivo evidence. *Exp. Neurol.* 222(1): 6-9.
- Gunn, A.P., Wong, B.X., Johanssen, T., Griffith, J.C., Masters, C.L., Bush, A.I., Barnham, K.J., Duce, J.A., Cherny, R.A. 2016. Amyloid- β peptide A β 3pE-42 induce lipid peroxidation, membrane permeabilization, and calcium influx in neurons. *J. Biol. Chem.* 291(12): 6134-45.
- Guevara, J., Dilhuydy, H., Espinosa, B., Delacourte, A., Quirion, R., Mena, R., Joannette, Y., Zenteno, E., Robitaille, Y. 2004. Coexistence of reactive plasticity and

neurodegeneration in Alzheimer diseased brains. *Histol. Histopathol.* 19(4): 1075-1084.

H

- Haass, C., Selkoe, D.J., 2007. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lesson from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8(2): 101-112.
- Halliwell, B. 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are now? *J. Neurochem.* 97: 1634-1658.
- Hardy, J., Selkoe, D.J. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 297(5580): 353-356.
- Harkany, T., O'mahony, S., Kelly, J.P., Soos, K., Toro, I., Penke, B. 1998. β -Amyloid (Phe(SO₃)₂₄)₂₅₋₃₅ in rat nucleus basalis induces behavioral dysfunctions, impairs learning and memory and disrupt cortical cholinergic innervation. *Behav. Brain. Res.* 90: 133-145.
- Harkany, T., Abrahám, I., Timmerman, W., Laskay, G., Tóth, B., Kónya, C., Sebens, J.B., Korf, J., Nyakas, C., Zarándi, M., Soós, K., Penke, B., Luiten, P.G. 2000. Beta-amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate-triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis. *Eur. J. Neurosci.* 12(8): 2735-2745.
- Hayashi, M.L., Choi, S.Y., Rao, B.S., Jung, H.Y., Lee, H.K., Zhang, D., Chattarji, S., Kirkwood, A., Tonegawa, S. 2004. Altered cortical synaptic morphology and impaired memory consolidation in forebrain-specific dominant-negative PAK transgenic mice. *Neuron.* 42: 773-787.
- Henderson, H.C., Sethi, T. 2009. The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunol. Rev.* 230(1): 160-71.
- Heneka, M.T., Rodríguez, J.J., Verkhratsky, A. 2010. Neuroglia in neurodegeneration. *Brain Res. Rev.* 63(1-2): 189-211.
- Heneka, M.T., Kummer, M.P., Latz, E. 2014. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Immunol.* 14(7): 463-77.
- Heneka, M.T., Carson, M.J., El Khoury, J., Landreth, G.E., Brosseron, F., Feinstein, D.L., Jacobs, A.H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R.M., Herrup, K., Frautschy, S.A., Finsen, B., Brown, G.C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Petzold, G.C., Town, T., Morgan, D., Shinohara, M.L., Perry, V.H., Holmes, C., Bazan, N.G., Brooks, D.J., Hunot, S., Joseph, G.M., Golenbock,

D.T., Kummer, M.P. 2015. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 14(4): 388-405.

- Hirabayashi, J., Hashidate, T., Arata, Y., Nishi, N., Nakamura, T., Hirashima, M., Urashima, T., Oka, T., Futai, M., Muller, W.E., Yagi, F., Kasai, K. 2002. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta.* 1572(2-3): 232-54.
- Hu, X., Li, P., Guo, Y., Wang, H., Leak, R.K., Chen, S., Gao, Y., Chen, J. 2012. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke.* 43(11): 3063-3070.
- Huong, N.Q., Nakamura, Y., Kuramoto, N., Yoneyama, M., Nagashima, R., Shiba, T., Yamaguchi, T., Hasebe, S., Ogita, K. 2011. Indomethacin ameliorates trimethyltin-induced neuronal damage in vivo by attenuating oxidative stress in the dentate gyrus of mice. *Biol. Pharm. Bull.* 34: 1856-1863.

I

- Ihrle, R.A., Álvarez-Buylla, A. 2011. Lake-front property: A unique germinal niche by the lateral ventricles of the adult brain. *Neuron.* 70(4): 674-686.
- Imaizumi, Y., Sakaguchi, M., Morishita, T., Ito, M., Poirier, F., Sawamoto, K., Okano, H. 2011. Galectin-1 is expressed in early-type neural progenitor cells and down-regulates neurogenesis in the adult hippocampus. *Mol. Brain.* 4: 7.
- Insausti, R., Amaral, G.G. 2004. "Hippocampal formation", in the human Nervous System, eds G. Paxinos and J.K. Mai (New York: Elsevier), 871-914.

J

- Jeon, S.B., Yoon, H.J., Chang, C.Y., Koh, H.S., Jeon, S.H., Park, E.J. 2010. Galectin-3 exerts cytokine regulatory actions through the JAK-STAT pathway. *J. Immunol.* 185: 7037-7046.
- Ji, K., Akgul, G., Wollmuth, L.P., Tsirka, S.E. 2013. Microglia actively regulate the number of functional synapses. *Plos One.* 8: e56293.
- Jiang, H.R., Al Rasebi, Z., Mensah-Brown, E., Shahin, A., Xu, D., Goodyear, C.S., Fukuda, S.Y., Liu, F.T., Liew, F.Y., Lukic, M.L. 2009. Galectin-3 deficiency reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 182(2): 1167-1173.
- Jin, K., Peel, A., Mao, X., Xie, L., Cottrell, B., Henshall, D., Greenberg, D. 2004. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *PNAS.* 101: 343-347.

- Johnson, J.L., Jones, M.B., Ryan, S.O., Cobb, B.A. 2013. The regulatory power of glycans and their binding partners in immunity. *Trends Immunol.* 34(6): 290-298.
- Jucker, M., Walker, L.C. 2013. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature.* 501(7465): 45-51.

K

- Kandel, E. 2001. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science.* 294: 1030-1038.
- Kaneko, N., Marín, O., Koike, M., Hirota, Y., Uchiyama, Y., Wu, J.Y., Lu, Q., Tessier-Lavigne, M., Alvarez-Buylla, A., Okano, H., Rubenstein, J.L., Sawamoto, K. 2010. New neurons clear the path of astrocytic processes for their rapid migration in the adult brain. *Neuron.* 67(2): 213-223.
- Kawanokuchi, J., Shimizu, K., Nitta, A., Yamada, K., Mizuno, T., Takeuchi, H., Suzumura, A. 2008. Production and function of IL-17 in microglia. *J. Neuroimmunol.* 194: 54-61.
- Keil, U., Bonert, A., Marques C.A., Scherping, I., Weyermann, J., Strosznajder J.B., Müller-Spahn, F., Haass C., Czech, C., Pradier, L., Müller W.E., Eckert, A., 2004. Amyloid β -induced changes in nitric oxide production and mitochondrial activity lead to apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279(48): 50310-20.
- Kempermann, G., Wiskott, L., Gage, F.H. 2004. Functional significance of adult neurogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14(2): 186-191.
- Kesner, R.P. 2007. Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus. *Learn. Mem.* 14: 771-781.
- Kesner, R.P. 2013a. An analysis of the dentate gyrus function. *Behav. Brain Res.* 254: 1-7.
- Kesner, R.P. 2013b. Role of the hippocampus in mediating interference as measured by pattern separation processes. *Behav. Processes.* 93: 148-154.
- Kim, K., Mayer, E.P., Nachtigal, M. 2003. Galectin-3 expression in macrophage is signaled by Ras/MAP kinase pathway and up-regulated by modified lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1641(1): 13-23.
- Kirkley, K.S., Popichak, K.A., Afzali, M.F., Legare, M.E., Tjalkens, R.B. 2017. Microglia amplify inflammatory activation of astrocytes in manganese neurotoxicity. *J. Neuroinflammation.* 14(1): 99.
- Kizuka, Y., Kitazume, S., Taniguchi, N. 2017. N-glycan and Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1861(10): 2447-2454.

- Kleene, R., Schachner, M. 2004. Glycans and neural cell interactions. *Nat. Rev. Neurosci.* 5(3): 195-208.
- Knobloch, M., Mansuy, I.M. 2008. Dendritic spine loss and synaptic alterations in Alzheimer's disease. *Mol. Neurobiol.* 37(1): 73-82.
- Koizumi, H., Higginbotham, H., Poon, T., Tanaka, T., Brinkman, B.C., Gleeson, J.G. 2006. Doublecortin maintains bipolar shape and nuclear translocation during migration in the adult forebrain. *Nat. Neurosci.* 9: 779-786.
- Kronenberg, G., Reuter, K., Steiner, B., Brandt, M.D., Jessberger, S., Yamaguchi, M., Kempermann, G. 2003. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J. Comp. Neurol.* 467(4): 455-63.
- Kubo, T., Nishimura, S., Kumagai, Y., Kaneko, I., 2002. In vivo conversion of racemized β -amyloid ([D-Ser²⁶] A β 1-40) to truncated and toxic fragments ([D-Ser²⁶] A β 25-35/40) and fragment presence in the brains of Alzheimer's patients. *J. Neurosci. Res.* 70(3): 474-483.
- Kuhn, H.G., Dickinson-Anson, H., Gage, F.H. 1996. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: Age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* 16(6): 2027-2033.

L

- Lalancette-Hébert, M., Swarup, V., Beaulieu, J.M., Bohacek, I., Abdelhamid, E., Weng, Y.C., Sato, S., Kriz, J. 2012. Galectin-3 is required for resident microglia activation and proliferation in response to ischemic injury. *J. Neurosci.* 32: 10383-10395.
- Lamprecht, R., LeDoux, J. 2004. Structural plasticity and memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 5: 45-54.
- Latta, C.H., Brothers, H.M., Wilcock, D.M. 2015. Neuroinflammation in Alzheimer's disease; A source of heterogeneity and target for personalized therapy. *Neuroscience.* 302: 103-111.
- Lawrence, T. 2009. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold. Spring Harb. Perspect. Biol.* 1: a001651.
- Lazcano, Z., Solis, O., Bringas, M.E., Limón, D., Díaz, A., Espinosa, B., García-Peláez, I., Flores, G., Guevara, J. 2014. Unilateral injection of A β ₂₅₋₃₅ in the hippocampus reduces the number of dendritic spines in hyperglycemic rats. *Synapse.* 68: 585-594.

- Lee, M.S., Kim, Y.J. 2007. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu. Rev. Biochem.* 76: 447-480.
- Lee, Y.J., Han, S.B., Nam, S.Y., Oh, K.W., Hong, J.T. 2010. Inflammation and Alzheimer's disease. *Arch. Pharm. Res.* 33(10): 1539-1556.
- Lemaire, V., Tronel, S., Montaron, M.F., Fabre, A., Dugast, E., Abrous, D.N. 2012. Long-lasting plasticity of hippocampal Adult-Born neurons. *J. Neurosci.* 32: 3101-3108.
- Leuner, B., Gould, E., Shors, T.J. 2006. Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus.* 16: 216-224.
- Leuner, B., Mendolia-Loffredo, S., Kozorovitskiy, Y., Samburg, D., Gould, E., Shors T.J. 2004. Learning enhances the survival of new neurons beyond the time when the hippocampus is required for memory. *J. Neurosci.* 24(34): 7477-7481.
- Leutgeb, J.K., Leutgeb, S., Moser, M.B., Moser, E.I. 2007. Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science.* 315(5814): 961-966.
- Li, Y., Komai-Koma, M., Gilchrist, D.S., Hsu, D.K., Liu, F.T., Springall, T., Xu, D. 2008. Galectin-3 is a negative regulator of lipopolysaccharide-mediated inflammation. *J. Immunol.* 181: 2781-2789.
- Li, Y., Mu, Y., Gage, F.H. 2009. Development of neural circuits in the adult hippocampus. *Curr. Top. Dev. Biol.* 149-173.
- Li, Z.W., Rickert, R.C., Karin, M. 2004. Genetic dissection of antigen receptor induced-NF-kappaB activation. *Mol. Immunol.* 41: 701-714.
- Limón, I.D., Díaz, A., Mendieta, L., Chamorro, G., Espinosa, B., Zenteno, E., Guevara, J. 2009. Amyloid- β_{25-35} impairs memory and increases NO in the temporal cortex o rats. *Neurosci. Res.* 63(2): 129-137.
- Limón, I.D., Ramírez E., Díaz, A., Mendieta, L., Mayoral, M.A., Espinosa, B., Guevara, J., Zenteno, E. 2011. Alteration of the sialylation pattern and memory deficits by injection of A $\beta_{(25-35)}$ into the hippocampus of rats. *Neurosci. Lett.* 495(1): 11-16.
- Lin, H., Bhatia, R., Lal, R. 2001. Amyloid β protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *FASEB J.* 15(13): 2433-2444.
- Liu, F.T., Patterson, R.J., Wang, J.L. 2002. Intracellular functions of galectins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1572: 263-273.
- Liu, F.T., Rabinovich, G.A. 2005. Galectins as modulators of tumor progression. *Nat. Rev. Cancer.* 5(1): 29-41.

- Liu, F.T., Rabinovich, G.A. 2010. Galectins: regulators of acute and chronic inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1183: 158-82.
- Liu, F.T., Yang, R.Y., Hsu, D.K. 2012. Galectins in acute and chronic inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1253: 80-91.
- Lotz, M., Ebert, S., Esselmann, H., Iliev, A.I., Prinz, M., Wiazewicz, N., Wiltfang, J., Gerber, J., Nau, R. 2005. Amyloid beta peptide 1-40 enhances the action of toll-like receptor-2 and -4 agonists but antagonizes toll-like receptor-9-induced inflammation in primary mouse microglial cell cultures. *J. Neurochem.* 94(2): 289-298.
- Lynch, M.A. 2010. Age-related neuroinflammatory changes negatively impact on neuronal function. *Front. Aging Neurosci.* 1: 6.

M

- Maccioni, F. 2010. Double-contrast magnetic resonance imaging of the small and large bowel: effectiveness in the evaluation of inflammatory bowel disease. *Abdom Imaging.* 35(1): 31-40.
- MacKinnon, A.C., Farnworth, S.L., Hodkinson, P.S., Henderson, N.C., Atkinson, K.M., Leffler, H., Nilsson, U.J., Haslett, C., Forbes, S.J., Sethi, T. 2008. Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3. *J. Immunol.* 180: 2650-2658.
- Mattson, M.P. 2004. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature.* 430(7000): 631-639.
- Matus, A. 2005. Growth of dendritic spines: a continuing story. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15: 67-72.
- Maurice, T., Su, T.P., Privat, A. 1998. Sigma1 (sigma 1) receptor agonists and neurosteroids attenuate B25-35-amyloid peptide-induced amnesia in mice through a common mechanism. *Neuroscience.* 83(2): 413-28.
- McDonald, P., Overmier, B. 1998. Present imperfect: A critical review of animal models of the mnemonic impairments in Alzheimer's disease. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 22(1): 99-120.
- McGaugh, J.L. 2000. Memory- a Century of consolidation. *Science.* 287(5451): 248-251.
- McGeer, E.G., McGeer, P.L. 2001. Innate immunity in Alzheimer's disease: a model for local inflammatory reactions. *Mol. Interv.* 1(1): 22-29.
- McGeer, E.G., McGeer, P.L. 2010. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a field in its infancy. *J. Alzheimers Dis.* 19(1): 355-361.

- Ming, G.L., Song, H. 2005. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 28: 223-250.
- Ming, G.L., Song, H. 2011. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Cell.* 70: 687-702.
- Monje, M.L., Toda, H., Palmer, T.D. 2003. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science.* 302: 1760-1765.
- Morales, I., Guzmán-Martínez, L., Cerda-Troncoso, C., Farías, G.A., Maccioni, R.B. 2014. Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Front. Cell. Neurosci.* 8: 112.
- Morgado, I. 2005. Psicobiología del aprendizaje y la memoria: fundamentos y avances recientes. *Rev. Neurol.* 40: 289-297.
- Morris, R. 1984. Development of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods.* 11: 47-40.
- Moynagh, P.N. 2005. TLR signaling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway. *TRENDS Immunol.* 26: 469-476.
- Mu, Y., Gage, F.H., 2011. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* 6: 85.

N

- Nagale, R.G., D'Andrea, M.R., Lee, H., Venkataraman, V., Wang, H.Y. 2003. Astrocytes accumulate A beta 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. *Brain Res.* 971(2): 197-209.
- Nakahara, S., Oka, N., Raz, A. 2005. On the role galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis.* 10(2): 267-275.
- Nakazawa, K., Quirk, M.C., Chitwood, R.A., Watanabe, M., Yeckel, M.F., Sun, L.D., Kato, A., Carr, C.A., Johnston, D., Wilson, M.A., Tonegawa, S. 2002. Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptor in associative memory recall. *Science.* 297: 211-218.
- Nakazawa, K., McHugh, T.J., Wilson, M.A., Tonegawa, S. 2004. NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 5(5): 361-372.
- Nicoll, J.A., Weller, R.O. 2003. A new role for astrocytes: beta amyloid homeostasis and degradation. *Trends Mol. Med.* 9(7): 281-282.

- Nielsen, H.M., Mulder, S.D., Beliën, J.A., Musters, R.J., Eikelenboom, P., Veerhuis, R. 2010. Astrocytic A beta 1-42 uptake is determined by A beta-aggregation state and the presence of amyloid-associated proteins. *Glia*. 58(10): 1235-1246.
- Norling, L.V., Sampaio, A.L., Cooper, D., Perretti, M. 2008. Inhibitory control of endothelial galectin-1 on in vitro and in vivo lymphocyte trafficking. *FASEB J*. 22: 682-690.

O

- O'Keefe, J., Nadel, L. 1978. *The hippocampus as a cognitive map*. Clarendon Press, Oxford.
- O'Keefe, J. 1979. A review of the hippocampal place cells. *Prog Neurobiol*. 13: 419-439.
- O'Mara, S.M., Commins, S., Anderson, M., Gigg, J. 2001. The subiculum: a review of form, physiology, and function. *Prog. Neurobiology*. 64: 129-155.
- Ortega, L., Calvillo, M., Luna, F., Pérez-Severiano, F., Rubio-Osorio, M., Guevara, J., Limón, I.D. 2014. 17-AAG improves cognitive process and increases heat shock protein response in a model lesion with A β 25-35. *Neuropeptides*. 48(4): 221-32.

P

- Parameshwaran, K., Dhanasekaran, M., Suppiramaniam, V. 2008. Amyloid beta peptide and glutamatergic synaptic dysregulation. *Exp. Neurol*. 210(1): 7-13.
- Park, P., Volianski, A., Sanderson, T.M., Bortolotto, Z.A., Jane, D.E., Zhuo, M., Kaang, B.K., Collingridge, G.L. 2013. NMDA receptor-dependent long-term potentiation comprises a family of temporally overlapping forms of synaptic plasticity that are induced by different patterns of stimulation. *Philos. Trans R. Soc. Lond. B. Biol. Sci*. 369(1633): 20130131.
- Parkhurst, C.N., Yang, G., Nina, I., Savas, J.N., Yates, J.R. 3rd, Lafaille, J.J., Hempstead, B.L., Littman, D.R. Gan, W.B. 2013. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell*. 155: 1596-1609.
- Pasparakis, M. 2009. Regulation of tissue homeostasis by NF-kappaB signalling: implications for inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol*. 9: 778-788.
- Paton, J.A., Nottebohm, F.N. 1984. Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science*. 225(4666): 1046-1048.

- Patricio-Martínez, A., Mendieta, L., Martínez, I., Aguilera, J., Limón, I.D. 2016. The recombinant fragment of tetanus toxin protects against cholinotoxicity by intraseptal injection of β -amyloid peptide (25-35) in rats. *Neuroscience*. 315: 18-30.
- Pawluski, J.L., Valenca, A., Santos, A.I.M., Costa-Nunes, J.P., Steinbusch H.W.M., Strekalova, T. 2012. Pregnancy or stress decrease complexity of CA3 pyramidal neurons in the hippocampus of adult female rats. *Neuroscience*. 227: 201-210.
- Paxinos, G., Watson, C. 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, New York, NY.
- Pike, C.J., Burdick, D., Walencewicz, A.J., Glabe, C.G., Cotman, C.W. 1993. Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J. Neurosci*. 13(4): 1676-1687.
- Pike, C.J., Walencewicz-Wasserman, A.J., Kosmoski, J., Cribbs, D.H., Glabe, C.G., Cotman, C.W. 1995. Structure-activity analyses of β -amyloid peptides: contributions of the β -25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *J. Neurochem*. 64(1): 253-265.
- Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretzshmar, H.A., Herms, J. 2006. Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J. Neurosci*. 26(27): 7212-7221.

R

- Rabinovich, G.A., Baum, L.G., Tinari, N., Paganelli, R., Natoli, C., Liu, F.T., Iacobelli, S. 2002. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol*. 23(6): 313-20.
- Rabinovich, G.A., Toscano, M.A., Jackson S.S., Vasta, G.R. 2007. Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Curr. Opin. Struct. Biol*. 17(5): 513-520.
- Rabinovich, G.A., Toscano, M.A. 2009. Turning “sweet” on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat. Rev. Immunol*. 9(5): 338-52.
- Rabinovich, G.A., Croci, D.O. 2012. Regulatory circuits mediated by lectin-glycan interactions in autoimmunity and cancer. *Immunity*. 36(3): 322-335.
- Rabinovich, G.A., van Kooyk, Y., Cobb, B.A. 2012. Glycobiology of immune response. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1253: 1-15.
- Radosavljevic, G., Volarevic, V., Jovanovic, I., Milovanovic, M., Pejnovic, N., Arsenijevic, N., Hsu, D.K., Lukic, M.L. 2012. The roles of galectin-3 in autoimmunity and tumor progression. *Imunol. Res*. 52: 100-110.

- Raman, R., Raguram, S., Venkataraman, G., Paulson, J.C., Sasisekharan, R. 2005. Glycomics: an integrated systems approach to structure-function relationships of glycans. *Nat. Methods.* 2(11): 817-24.
- Ramírez-Amaya, V., Escobar, M.L., Chao, V. Bermúdez-Rattoni, F. 1999. Synaptogenesis of mossy fibers induced by spatial water maze overtraining. *Hippocampus.* 9: 631-636.
- Ramírez-Amaya, V., Balderas, I., Sandoval, J., Escobar, M.L., Bermúdez-Rattoni, F. 2001. Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis. *J. Neurosci.* 21(18): 7340-7348.
- Reddy, P.H., Beal, M.F. 2008. Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends Mol. Med.* 14(2): 45-53.
- Reddy, P.H., Manczak, M., Mao, P., Calkins, M.J., Reddy, A.P., Shirendeb, U. 2010. Amyloid- β and mitochondria in aging and Alzheimer's disease: implications for synaptic damage and cognitive decline. *J. Alzheimers Dis.* 2: S499-512.
- Rodríguez J.J., Verkhratsky A. 2011. Neurogenesis in Alzheimer's disease. *J. Anat.* 219: 78-89.
- Romano, A., Freudenthal, R., Merlo, E., Routtenberg, A. 2006. Evolutionary conserved role of the NF- κ B transcription factor in neural plasticity and memory. *Eur. J. Neurosci.* 24: 1507-1516.
- Rosales-Corral, S., Tan, D.X., Reiter, R.J., Valdivia-Velázquez, M., Acosta-Martínez, J.P., Ortiz, G.G. 2004. Kinetics of the neuroinflammation-oxidative stress correlation in rat brain following the injection of fibrillar amyloid- β onto the hippocampus in vivo. *J. Neuroimmunol.* 150: 20-28.
- Rosenberg, T., Gal-Ben-Ari, S., Dieterich, D.C., Kreutz, M.R., Ziv, N.E., Gundelfinger, E.D., Rosenblum, K. 2014. The roles of protein expression in synaptic plasticity and memory consolidation. *Front. Mol. Neurosci.* 7: 86.
- Routtenberg, A. 2013. Lifetime memories from persistently supple synapses. *Hippocampus.* 23(3): 202-206.
- Roy, D.S., Arons, A., Mitchell, T.I., Pignatelli, M., Ryan, T.J., Tonegawa, S., 2016. Memory retrieval by activating engram cells in mouse models of early Alzheimer's disease. *Nature.* 531: 508-512.
- Rubio-Pérez, J.M., Morillas-Ruiz, J.M. 2012. A review: Inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *ScientificWorldJournal.* 2012: 76357.

- Rudd, P.M., Elliott, T., Cresswell, P., Wilson, I.A., Dwek, R.A. 2001. Glycosylation and the immune system. *Science*. 291(5512): 2370-6.
- Ryan, T.J., Roy, D.S., Pignatelli, M., Arons, A., Tonegawa, S. 2015. Memory. Engram cells retain memory under retrograde amnesia. *Science*. 348(6238): 1007-1013.

S

- Sakaguchi, M., Shingo, T., Shimazaki, T., Okano, H.J., Shiwa, M., Ishibashi, S., Oguro, H., Ninomiya, M., Kadoya, T., Horie, H., Shibuya, A., Mizusawa, H., Poirier, F., Nakauchi, H., Sawamoto, K., Okano, H. 2006. A carbohydrate-binding protein, Galectin-1, promotes proliferation of adult neural stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103(8): 7112-7.
- Sakono, M., Zako, T. 2010. Amyloid oligomers: formation and toxicity of A β oligomers. *FEBS J*. 277(6): 1348-1358.
- Salloway, S., Sperling, R., Brashear, H.R. 2014. Phase 3 trials of solanezumab and bapineuzumab for Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med*. 370: 1460.
- Santucci, L., Fiorucci, S., Rubinstein, N., Mencarelli, A., Palazzetti, B., Federici, B., Rabinovich, G.A., Morelli, A. 2003. Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology*. 124(5): 1381-1394.
- Sasaki, T., Hirabayashi, J., Manya, H., Kasai, K., Endo, T. 2004. Galectin-1 induces astrocyte differentiation, which leads to production of brain-derived neurotrophic factor. *Glycobiology*. 14(4): 357-363.
- Sato, S., St-Pierre, C., Bhaumik, P., Nieminen, J. 2009. Galectins in innate immunity: dual function of host soluble β -galactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). *Immunol. Rev*. 230(1): 172-87.
- Satoh, K., Niwa, M., Binh, N.H., Nakashima, M., Kobayashi, T., Takamatsu, M., Hara, A. 2011a. Increased of galectin-3 expression in microglia by hyperthermia in delayed neuronal death of hippocampal CA1 following transient forebrain ischemia. *Neurosci. Lett*. 540: 199-203.
- Satoh, K., Niwa, M., Goda, W., Binh, N.H., Nakashima, M., Takamatsu, M., Hara, A. 2011b. Galectin-3 expression in delayed neuronal death of hippocampal CA1 following transient forebrain ischemia, and its inhibition by hypothermia. *Brain Res*. 1382, 266-274.

- Schedin-Weiss, S., Winblad, B., Tjernberg, L.O. 2014. The role of protein glycosylation in Alzheimer disease. *FEBS J.* 281(1): 46-62.
- Schmidt-Hieber, C., Jonas, P., Bischofberger, J. 2004. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature.* 429(6988): 184-187.
- Schubert, V., Dotti, C.G. 2007. Transmitting on actin: synaptic control of dendritic architecture. *J. Cell Sci.* 120: 205-212.
- Sekino, Y., Kojima, N., Shirao, T. 2007. Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis. *Neurochem. Int.* 51: 92-104.
- Selkoe, D. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* 2001; 81: 741-766.
- Selkoe, D.J., 2008. Soluble oligomers of the amyloid β -protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav. Brain Res.* 192(1): 106-113.
- Seri, B., Garcia-Verdugo, J.M., Collado-Morente, L., McEwen, B.S., Alvarez-Buylla, A. 2004. Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* 478: 359-378.
- Shankar, G.M., Bloodgood, G.L., Townsend, M., Walsh, D.M., Selkoe, D.J., Sabatini, B.L. 2007. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J. Neurosci.* 27(11): 2866-2875.
- Shimura, T., Takenaka, Y., Tsutsumi, S., Hogan, V., Kikuchi, A., Raz, A. 2004. Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin. *Cancer Res.* 64(18): 6363-6367.
- Shin, T. 2013. The pleiotropic effects of galectin-3 in neuroinflammation: A review. *Acta Histochem.* 115(5): 407-11.
- Sholl, D.A., 1953. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J. Anat.* 87:387-406.
- Shu, H., Deng, W., Gage, F.H. 2009. Signal in adult neurogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25: 253-275.
- Sirko, S., Irmeler, M., Gascón, S., Bek, S., Schneider, S., Dimou, L., Obermann, J., De Souza Paiva, D., Poirier, F., Beckers, J., Hauck, S.M., Barde, Y.A., Götz, M. 2015. Astrocyte reactivity after brain injury: the role of galectins 1 and 3. *Glia.* 63(12): 2340-61.

- Snyder, E.M., Nong, Y., Almeida, C.G., Paul, S., Moran, T., Choi, E.Y., Nairn, A.C., Salter, M.W., Lombroso, P.J., Gouras, G.K., Greengard, P., 2005. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- β . *Nat. Neurosci.* 8(8): 1051-1058.
- Snyder, J.S., Choe, J.S., Clifford, M.A., Jeurling, S.I., Hurley, P., Brown, A., Kamhi, F., Cameron, H.A. 2009. Adult-born hippocampal neurons are more numerous, faster maturing, and more involved in behavioral in rats than in mice. *J. Neurosci.* 29(46): 14484-14495.
- Sofroniew, M.V., Vinters, H.V. 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119(1): 7-35.
- Sofroniew, M.V. 2014. Multiple roles for astrocytes as effector of cytokines and inflammatory mediators. *Neuroscientist.* 20(2): 160-172.
- Sofroniew, M.V. 2015. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat. Rev. Neurosci.* 16(5): 249-263.
- Spruston, N., McBain, C. 2007. Structural and functional Properties of hippocampal Neurons. En: *The hippocampus book*. Oxford University Press. 133-201.
- Squire, L.R. 2004. Memory system of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiol. Learn. Mem.* 82(3): 171-177.
- Starossom, S.C., Mascanfroni, I.D., Imitola, J., Cao, L., Raddassi, K., Hernandez, S.F., Bassil, R., Croci, D.O., Cerliani, J.P., Delacour, D., Wang, Y., Elyman, W., Khoury, S.J., Rabinovich, G.A. 2012. Galectin-1 deactivates classically activated microglia and protects from inflammation-induced neurodegeneration. *Immunity.* 37(2): 249-63.
- Stepanichev, M.Y., Onufriev, M.V., Yakovlev, A.A., Khrenov, A.I., Peregud, D.I., Vorontsova, O.N., Lazareva, N.A., Gulyaeva, N.V. 2008. Amyloid-beta (25-35) increases activity of neuronal NO-synthase in rat brain. *Neurochem. Int.* 52(6): 1114-1124.
- Stowell, S.R., Arthur, C.M., Mehta, P., Slanina, K.A., Blixt, O., Leffler, H., Smith D.F., Cummings, R.D. 2008. Galectin-1, -2, and -3 exhibit differential recognition of sialylated glycans and blood group antigens. *J. Biol. Chem.* 283: 10109-10123.
- Stulchlik, A. 2014. Dynamic learning and memory, synaptic plasticity and neurogenesis: an update. *Front. Behav. Neurosci.* 8: 106.
- Su, F., Bai, F., Zhang, Z. 2016. Inflammatory cytokines and Alzheimer's Disease: A review from the perspective of genetic polymorphisms. *Neurosci. Bull.* 32(5): 469-480.

- Swanson, R.A., Ying, W., Kauppinen, T.M. 2004. Astrocytes influences on ischemic neuronal death. *Curr. Mol. Med.* 4: 193-205.
- Sweatt, J.D. 2016. Neural plasticity and behavior – sixty years of conceptual advances. *J. Neurochem.* 2: 179-199.

T

- Takeda, K., Akira, S. 2004. Microbial recognition by toll-like receptors. *J. Dermatol. Sci.* 34(2): 73-82.
- Takeuchi, T., Duskiewicz, A.J., Morris, R.G. 2013. The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 369(1633): 20130288.
- Tanzi R, Bertram, L. 2005. Twenty years of the Alzheimer’s disease amyloid hypothesis: A genetic perspective. *Cell.* 120: 545-555.
- Tashiro, A., Sandler, V.M., Toni, N., Zhao, C., Gage, F.H. 2006. NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature.* 442(7105): 929-33.
- Taupin, P. 2006. Neurogenesis in the adult central nervous system. *C.R. Biol.* 465-475.
- Thiemann, S., Baum, L.G. 2016. Galectins and immune responses - Just how do they do those things they do? *Annu. Rev Immunol.* 34: 243-64.
- Tonegawa, S., Pignatelli, M., Roy, D.S., Ryan, T.J. 2015a. Memory engram storage and retrieval. *Curr. Opin. Neurobiol.* 35: 101-109.
- Tonegawa, S., Liu, X., Ramirez, S., Redondo, R. 2015b. Memory engram cells have come age. *Neuron.* 87(5): 918-931.
- Toscano, M.A., Commodaro, A.G., Ilarregui, J.M., Bianco, G.A., Liberman, A., Serra, H.M., Hirabayashi, J., Rizzo, L.V., Rabinovich, G.A. 2006. Galectin-1 suppresses autoimmune retinal disease by promoting concomitant Th2- and T regulatory-mediated anti-inflammatory responses. *J. Immunol.* 176: 6323-6332.
- Toscano, M.A., Campagna, L., Molinero, L.L., Cerliani, J.P., Croci, D.O., Ilarregui J.M., Fuentes, M.B., Nojek, I.M., Fededa, J.P., Zwirner, N.W., Costas, M.A., Rabinovich, G.A. 2011. Nuclear factor (NF)- κ B controls expression of the immunoregulatory glycan-binding protein galectin-1. *Mol. Immunol.* 48(15-16): 1940-9.
- Tsien, J.Z. 2000. Linking Henn’s coincidence-detection to memory formation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10: 266-273.

- Turner, P.R, O'Connor, K., Tate, W.P., Abraham, W.C. 2003. Roles of amyloid precursor and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog. Neurobiol.* 70(1): 1-32.

V

- Vallabhapurapu, S., Karin, M. 2009. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 27: 693-733.
- van Kooyk, Y., Rabinovich, G.A. 2008. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune response. *Nat. Immunol.* 9(6): 593-601.
- van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F.G. 1999. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature Neurosci.* 2: 266-270.
- van Praag, H., Schinder, A.F., Christie, B.R., Toni, N., Palmer, T.D., Gage, F.H. 2002. Functional neurogenesis in the hippocampus. *Nature.* 415: 1030-1034.
- van Strien, N.M., Cappaert, N.L.M., Witter, M.P. 2009. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat. Rev. Neurosci.* 10(4): 272-282.
- Varadarajan, S., Kanski, J., Aksenova, M., Lauderback, C., Butterfield, D.A. 2001. Different mechanism of oxidative stress and neurotoxicity for Alzheimer's A beta (1-42) and A beta (25-35). *J. Am. Chem. Soc.* 123(24): 5625-5631.
- Varki, A. 2017. Biological roles of glycans. *Glycobiology.* 27(1): 3-49.
- Vasta, G.R. 2009. Roles of galectins in infection. *Nat. Rev. Microbiol.* 7(6): 424-438.
- Vasta, G.R., Ahmed, H., Nita-Lazar, M., Banerjee, A., Pasek, M., Shridhar, S., Guha, P., Fernández-Robledo, J.A. 2012. Galectin as self/non-self recognition receptors in innate and adaptive immunity: an unresolved paradox. *Front. Immunol.* 3: 199.

W

- Walsh, D.M., Selkoe, D.J. 2004. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease. *Neuron.* 44(1): 181-193.
- Walther, M., Kuklinski, S., Pesheva, P., Guntinas-Lichius, O., Angelov, D.N., Neiss, W.F., Asou, H., Probstmeier, R. 2000. Galectin-3 is upregulated in microglial cells in response to ischemic brain lesions, but not to facial nerve axotomy. *J. Neurosci. Res.* 61(4): 430-435.

- Wan, L., Liu, T.F. 2016. Galectin and inflammation. *Glycobiology Insights*. 6:1-9.
- Wang, H., Ferguson, G.D., Pineda, V.V., Cundiff, P.E., Storm, D.R. 2004. Overexpression of type-1 adenylyl cyclase in mouse forebrain enhances recognition memory and LTP. *Nat. Neurosci.* 7: 635-642.
- Wang, H., Hu, Y., Tsien, J.Z. 2006. Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. *Prog. Neurobiol.* 79(3): 123-35.
- Wesley, U.V., Vemuganti, R., Ayvaci, E.R., Dempsey, R.J. 2013. Galectin-3 enhanced angiogenic and migratory potential of microglia cells via modulation of integrin linked kinase signaling. *Brain Res.* 1496: 1-9.
- Whitney, N.P., Eidem, T.M., Peng, H., Huang, Y., Zheng, J.C. 2009. Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders. *J. Neurochem.* 108: 1343-1359.
- Witter, M., Amaral, D. 2004. Hippocampal formation En: *The rat nervous system*, third edition. Elsevier. 635-704.
- Wyss-Coray, T., Loike, J.D., Brionne, T.C., Lu, E., Anankov, R., Yan, F., Silverstein, S.C., Husemann, J. 2003. Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat. Med.* 9(4): 453-457.

Y

- Yamada, K., Nabeshima, T. 2000. Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharmacol. Ther.* 88(2): 93-113.
- Yan, Y.P., Lang, B.T., Vemuganti, R., Dempsey, R.J. 2009. Galectin-3 mediates post-ischemic tissue remodeling. *Brain Res.* 1288: 116-124.
- Yang, M., Kim, J., Kim, T., Kim, S.H., Kim, J.C., Kim, J., Takayama, C., Hayashi, A., Joo, H.G., Shin, T., Moon, C. 2012. Possible involvement of galectin-3 in microglial activation in the hippocampus with trimethyltin treatment. *Neurochem. Int.* 61(7): 955-62.
- Yang, R.Y., Rabinovich, G.A., Liu, F.T. 2008. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert. Rev. Mol. Med.* 10: e17.
- Yanker, B.A., Duffy, L.K., Kirschner, D.A. 1990. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science.* 250(4978): 279-82.
- Yu, W., Lu, B. 2012. Synapses and dendritic spines as pathogenic targets in Alzheimer's disease. *Neural. Plast.* 2012: 247150.

Z

- Zhao, C., Deng, W., Gage, F.H. 2008. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*. 132: 645-660.
- Zhao, C., Teng, E.M., Summers, R., Ming, G., Gage, F. 2006. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J. Neurosci*. 26: 3-11.
- Zheng, W.H., Bastianetto, S., Mennicken, F., Ma, W., Kar, S. 2002. Amyloid beta peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. *Neuroscience*. 115(1): 201-211.
- Zhong, W., Chia, W. 2008. Neurogenesis and asymmetric cell division. *Curr. Opin. Neurobiol*. 18(1): 4-11.
- Zussy, C., Brureau, A., Delair, B., Marchal, S., Keller, E., Ixart, G., Naert, G., Meunier, J., Chevallier, N., Maurice, T., Givalois, L. 2011. Time-Course and regional analyses of the physiopathological changes induced after cerebral injection of an Amyloid β fragment in rats. *Am. J. Pathol*. 179: 315-334.
- Zussy, C., Brureau, A., Keller, E., Marchal, S., Blayo, C., Delair, B., Ixart, G., Maurice, T., Givalois, L. 2013. Alzheimer's disease related markers, cellular toxicity and behavioral deficits induced six weeks after oligomeric amyloid- β peptide injection in rats. *Plos One* 8: e53117.