



Universidad de Valparaíso
Facultad de Medicina
Escuela de Tecnología Médica



**“Efecto del bloqueo farmacológico de canales de Panexina1
sobre las alteraciones morfológicas cerebrales y cognitivas en un
modelo murino de la enfermedad de Alzheimer”**

**Seminario de Grado
presentado en conformidad a los requisitos para obtener el Grado
Académico de “Licenciado en Tecnología Médica con mención en
Morfofisiopatología y Citodiagnóstico”**

Bárbara Gómez Soto

Elena Mery Bombal

Profesor Guía: Álvaro Ardiles Araya

Profesor Co-guía: Daniela López Espíndola

2019

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, queremos expresar nuestro agradecimiento a nuestros profesores guía, Álvaro Ardiles, y co-guía, Daniela López, por recibirnos en este proyecto, por el cariño y el tiempo dedicado al desarrollo de este trabajo; por enseñarnos, orientarnos, aumentar nuestros conocimientos y darnos la confianza de ser parte de este equipo maravilloso que es el Laboratorio de sinaptopatías “ALab”. siempre los tendremos en nuestros corazones con mucho cariño. También queremos manifestar nuestro agradecimiento al laboratorio de ciencias morfológicas de la Universidad de Valparaíso, especialmente al profesor Juan Varas, que nos ayudó enormemente en el quehacer de nuestras técnicas. Al servicio de Anatomía patológica del Hospital Carlos Van Buren y su maravilloso equipo de trabajo liderado por Rodrigo Zúñiga, que nos brindó su ayuda para poder ir a procesar y cortar nuestras muestras. Y finalmente a todas las personas increíbles que tuvimos el agrado de conocer a lo largo de nuestra estadía en el Edificio Bruno Gunther. Muchas gracias por toda la ayuda y experiencia que nos brindaron, y sobretodo, gracias por cada una de las instancias que hicieron que este proceso de tesis fuese una grata experiencia que recordaremos con mucho cariño.

Bárbara: Quiero agradecer enormemente a mis padres por siempre estar conmigo, apoyándome incondicionalmente, dándome fuerzas y aliento para cumplir todas mis metas, por creer en mí y por enseñarme que el esfuerzo siempre rinde frutos, son lo mejor. A mi amada Antonella, eres mi inspiración, la fuerza que me impulsa a superarme y a cada día a ser mejor, todo es por y para ti. A mi familia, mi abuela, mi tía mis primas-hermanas, gracias por siempre apoyarme en cada proceso y por darme tanto ánimo. A mi pareja, Nicolás, gracias por ser un compañero, por estar siempre a mi lado animándome y por siempre hacerme feliz. A mis amigas macanudas hermosas que están conmigo hace más de 15 años, gracias por existir en mi vida y por siempre estar conmigo dándome alegrías. A mis amigos Nataly, Nicole, JuanPablo, Marlon, Paulina y Alexis, todos ustedes son personas que agradezco enormemente haber conocido en este proceso, son maravillosos!

Elena: En primer lugar, quisiera agradecer a mis padres por confiar en mí, por creer en mis capacidades y por estar presentes durante todo el transcurso de este proceso. A mi familia: tíos, primos y abuelos, por sus palabras de ánimo y apoyo incondicional. Y finalmente, agradecer a mis amigos, por estar presentes durante esta etapa, por sus palabras de apoyo que me ayudaron a continuar y finalizar esta maravillosa etapa.

FINANCIAMIENTO

Este estudio se realizó con financiamiento de los proyectos que se mencionan a continuación:

| | |
|---------------------------------|--|
| Nombre del proyecto | “A novel role of Pannexin 1 channels in the synaptopathy associated to the soluble amyloid β oligomers in Alzheimer’s disease” |
| Institución | Universidad de Valparaíso |
| Investigador responsable | Álvaro Ardiles Araya |
| Financiamiento | FONDECYT N°11150776, Gobierno de Chile |

| | |
|---------------------------------|---|
| Nombre del proyecto | “Efecto del bloqueo farmacológico de canales de Panexina1 sobre las alteraciones morfológicas cerebrales y cognitivas en un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer” |
| Institución | Universidad de Valparaíso |
| Investigador responsable | Bárbara Gómez Soto, Elena Mery Bombal |
| Financiamiento | Iniciativas Estudiantiles de la Universidad de Valparaíso 2018 “Desarrollo de una plataforma interdisciplinaria para la innovación en salud: un referente internacional en el desarrollo de medicina de precisión; UVA1402) |

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer es la principal condición neurodegenerativa que afecta a la población adulta mayor, caracterizada por una progresiva pérdida de la memoria. Un signo temprano característico de esta enfermedad es el déficit cognitivo, el cual se asocia fuertemente a la pérdida de sinapsis. Abundante evidencia muestra que la sinaptopatía observada en el paciente, antes de la ocurrencia de neurodegeneración, es causada por la presencia de oligómeros solubles del péptido β -Amiloide en el cerebro y en el líquido cefalorraquídeo. Estudios realizados en modelos animales de la enfermedad de Alzheimer demuestran que la activación y señalización de los receptores glutamatérgicos, forman parte del mecanismo tóxico inducido por los oligómeros solubles del péptido β -Amiloide. Este mecanismo conduciría a la pérdida de la estructura y funcionalidad de las sinapsis y de los mecanismos de plasticidad sináptica, este último considerado el modelo celular de la memoria y aprendizaje. Estudios recientes han demostrado una relación entre la actividad de los canales formados por Panexina 1 y los mecanismos patológicos asociados a la muerte neuronal en condiciones inflamatorias, particularmente asociadas a isquemia, daño cerebrovascular y toxicidad mediada por oligómeros solubles del péptido β -Amiloide. Más aún, existe evidencia que indica que, en condiciones fisiológicas, la actividad de los canales de Panexina 1 modula la inducción de la plasticidad sináptica, y su bloqueo tiene un efecto contrario al mecanismo de acción de los oligómeros solubles del péptido β -Amiloide. Considerando estos antecedentes, nosotros especulamos que Panexina 1 podría participar en el mecanismo fisiopatológico de la enfermedad de Alzheimer. Por esta razón, nos planteamos evaluar si el bloqueo farmacológico de los canales de Panexina 1 podría mediar las alteraciones morfológicas y conductuales observadas en un modelo animal de la enfermedad de Alzheimer.

PALABRAS CLAVES: Enfermedad de Alzheimer, sinapsis, oligómeros solubles de péptido β -amiloide, Panexina 1.

LISTA DE ACRÓNIMOS

aac: Aminoácidos

ApoE: Apolipoproteína E

APP: Proteína precursora amiloide (*Amyloid Precursor Protein*)

APP/PS1: Animal transgénico, modelo murino de la enfermedad de Alzheimer

A β : Péptido β -Amiloide

CA1, CA3: Cuerno de Amón 1 y 3

EA: Enfermedad de Alzheimer

GFAP: Proteína acídica fibrilar glial

KO: *Knock out*

LCA: Líquido cefalorraquídeo artificial

LCR: Líquido cefalorraquídeo

mGLUR: Receptor glutamatérgico de tipo metabotrópico

MRO: Memoria de reconocimiento de objetos

MT: Microtúbulo

MWM: Laberinto acuático de Morris

NMDA: Ácido N-metil-D-aspartico

NMDAR: Receptor glutamatérgico de tipo NMDA

OF: Campo abierto (*Open Field*)

os β A: Oligómeros solubles del péptido β -Amiloide

Panx: Panexina

PBN: Probenecid

PBS: Buffer fosfato salino (*Phosphate saline buffer*)

PS: Plasticidad sináptica

PSEN: Presenilina

sAPP β : Fragmento soluble de la APP cortado por la β -secretasa

sAPP α : Fragmento soluble de la APP cortado por la α -secretasa

SNC: Sistema nervioso central

WT: Silvestre (*Wild-type*)

TTO: Tratamiento

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Enfermedad de Alzheimer | 1 |
| 1.2 Procesamiento de la APP, generación del péptido β -Amiloide | 3 |
| 1.3 Hipótesis amiloide | 6 |
| 1.4 Enfermedad de Alzheimer, morfología neuronal y sinapsis | 10 |
| 1.5 Enfermedad de Alzheimer y memoria | 12 |
| CAPÍTULO 2. PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA | 15 |
| 2.1 Pregunta de investigación | 15 |
| 2.2 Hipótesis | 15 |
| 2.3 Relevancia | 15 |
| CAPÍTULO 3. OBJETIVOS | 16 |
| 3.1 Objetivo General | 16 |
| 3.2 Objetivos específicos | 16 |
| CAPÍTULO 4. MATERIALES Y METODOS | 17 |
| 4.1 Tipo de diseño | 17 |
| 4.2 Descripción de la población de estudio | 17 |
| 4.3 Muestreo y tamaño muestral | 18 |
| 4.4 Variables | 19 |
| 4.5 Fuentes y método de recolección de datos | 19 |
| 4.6 Criterios de inclusión y exclusión | 20 |
| 4.6.1 Criterios de inclusión: | 20 |
| 4.6.2 Criterios de exclusión: | 20 |
| 4.7 Estudios conductuales | 20 |
| 4.7.1 Test Open Field | 21 |
| 4.7.2 Memoria de Reconocimiento de Objetos | 22 |

| | |
|---|-----------|
| 4.7.3 Laberinto acuático de Morris | 24 |
| 4.8 Estudios histológicos | 26 |
| 4.8.1 Técnica de Hematoxilina-Eosina | 27 |
| 4.8.2 Técnica de Rojo Congo | 28 |
| 4.8.3 Técnica de Cresil violeta | 28 |
| 4.8.4 Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia | 29 |
| 4.8.5 Técnica de Golgi-Cox | 29 |
| 4.9 Manejo y análisis estadístico de los datos | 30 |
| 4.10 Consideraciones éticas | 31 |
| CAPÍTULO 5. RESULTADOS | 33 |
| 5.1 Estudios conductuales | 33 |
| 5.2 Estudios histológicos | 41 |
| 5.2.1 Análisis histológico general | 41 |
| 5.2.2 Detección de la proteína Panexina1 por Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia | 42 |
| 5.2.3 Estudio de neurodegeneración | 48 |
| 5.2.4 Estudio de morfología dendrítica | 50 |
| CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN | 54 |
| 6.1 Memoria y capacidad cognitiva | 55 |
| 6.2 Caracterización de la expresión de Panx1 | 56 |
| 6.3 PBN y astrocitos | 58 |
| 6.4 Signos neurodegenerativos | 59 |
| 6.5 PBN en arborización dendrítica | 59 |
| CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES | 63 |
| CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA | 64 |
| CAPÍTULO 9. ANEXOS | 78 |
| Anexo 1: Animales en conducta y tratamiento. | 78 |

| | |
|--|----|
| Anexo 2: Preparación Probenecid para Medigel | 79 |
| Anexo 3: Procesamiento de muestra | 81 |
| Anexo 4: Protocolo Hematoxilina – Eosina | 82 |
| Anexo 5: Protocolo Rojo congo | 83 |
| Anexo 6: Protocolo Golgi - Cox | 84 |
| Anexo 7: Protocolo Cresil violeta | 86 |
| Anexo 8: Protocolo inmunohistoquímica | 87 |
| Anexo 9: Protocolo Inmunofluorescencia | 89 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Lesiones histológicas características de la enfermedad de Alzheimer | 2 |
| Figura 2. Diagrama esquemático de la APP y su procesamiento..... | 4 |
| Figura 3. Hipótesis de la Cascada Amiloide. | 7 |
| Figura 4. Topología de membrana de los tres miembros de la familia de Panexinas y formación de panexones. | 10 |
| Figura 5: Laberintos utilizados en la caracterización conductual de OF..... | 22 |
| Figura 6: Laberintos utilizados en la caracterización conductual de MRO | 23 |
| Figura 7: Laberintos utilizados en la caracterización conductual de MWM..... | 26 |
| Figura 8. Diagrama representativo de grupos animales sometidos a evaluaciones conductuales. | 33 |
| Figura 9. Diagrama representativo de las trayectorias de recorrido en la medición de actividad locomotora en campo abierto, para ratones WT y APP / PS1..... | 34 |
| Figura 10. Efecto del bloqueo crónico de Panx-1 en la medición de actividad locomotora en campo abierto, para ratones WT y APP / PS1 | 35 |

| | |
|--|----|
| Figura 11. Diagrama representativo de la arena de entrenamiento donde se evaluó la memoria de reconocimiento de objetos, para ratones WT y APP / PS1 | 36 |
| Figura 12. Efecto del bloqueo crónico de Panx-1 en el Test de reconocimiento de objetos, en ratones WT y APP / PS1..... | 37 |
| Figura 13. Diagrama representativo de la piscina de entrenamiento donde se evaluó la memoria espacial en la prueba del laberinto acuático de Morris..... | 39 |
| Figura 14. Efecto del bloqueo crónico de Pannexina-1 en la prueba del laberinto acuático de Morris..... | 40 |
| Figura 15. Morfología general de corteza e hipocampo en animales WT y APP/PS1 con y sin tratamiento con PBN..... | 42 |
| Figura 16. Expresión de Panexina-1 a nivel de corteza e hipocampo del ratón WT y APP/PS1 con y sin tratamiento con PBN..... | 43 |
| Figura 17. Expresión general de Panx1 en el cerebro del ratón WT y APP/PS1..... | 44 |
| Figura 18. Expresión de Panexina-1 a nivel de corteza e hipocampo del ratón WT y APP/PS1..... | 45 |
| Figura 19. Expresión de Panx1 alrededor de placas amiloides..... | 46 |
| Figura 20. Astrocitos en corteza y CA1 en hipocampo marcados con técnicas de inmunofluorescencia. | 47 |
| Figura 21. Efecto del tratamiento crónico con PBN sobre la viabilidad celular en animales de 18 meses..... | 49 |
| Figura 22. Análisis de la morfología dendrítica de neuronas piramidales de CA1..... | 50 |
| Figura 23. El TTO crónico con PBN modificó la morfología dendrítica en ratones APP/PS1. | 51 |
| Figura 24. Clasificación de orden dendrítico para neuronas de CA1..... | 53 |

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

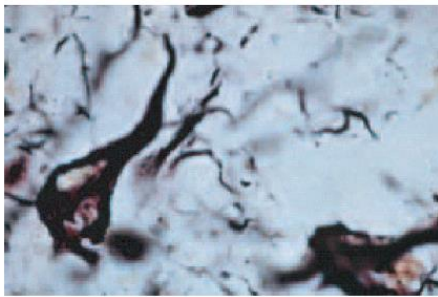
1.1 Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una condición neurodegenerativa devastadora que se caracteriza por una disminución progresiva de la memoria, lo que lleva finalmente a la pérdida de las capacidades de las personas de valerse por sí mismas (1).

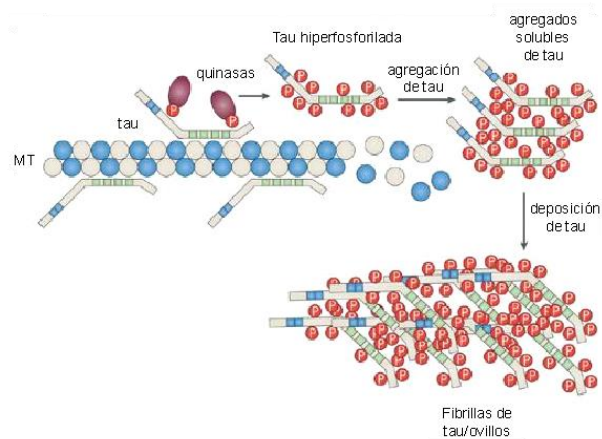
En general, la EA aparece en edad adulta, primordialmente en la vejez, donde representa la principal causa de demencia. En la actualidad, alrededor de 36.5 millones de personas padecen de esta enfermedad en el mundo y en nuestro país se estima que cerca de 220 mil chilenos sufren de EA (2). Considerando el creciente aumento en las expectativas de vida, sumado a las proyecciones sobre envejecimiento poblacional que indican que nuestro país será uno de los países con mayor aumento de la población adulta mayor (3), se hace necesario redoblar los esfuerzos conducentes a entender de mejor manera las causas que llevan al desarrollo de esta enfermedad.

Los dos signos histopatológicos característicos de esta enfermedad son los ovillos neurofibrilares, que corresponden a residuos intracelulares formados a partir de la acumulación de la proteína tau fosforilada aberrantemente, y las placas amiloides, que son depósitos extracelulares compuestos por acúmulos del péptido β -Amiloide ($A\beta$) (4) (Figura 1). Ambos agregados proteicos insolubles se acumulan y depositan en regiones del cerebro importantes para la memoria y el aprendizaje, y han sido identificados como causantes del proceso neurodegenerativo (5). Se sugiere que estas lesiones corresponden a etapas más avanzadas de la enfermedad (6), puesto que no existe una relación entre la aparición de estas lesiones y el déficit cognitivo temprano observado en pacientes.

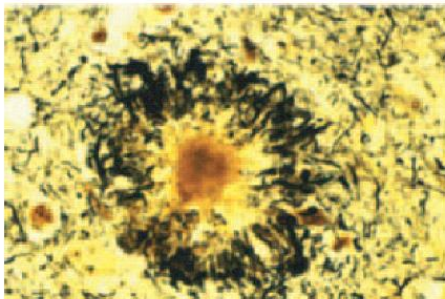
A



OVILLOS NEUROFIBRILARES



B



PLACAS AMILOIDES

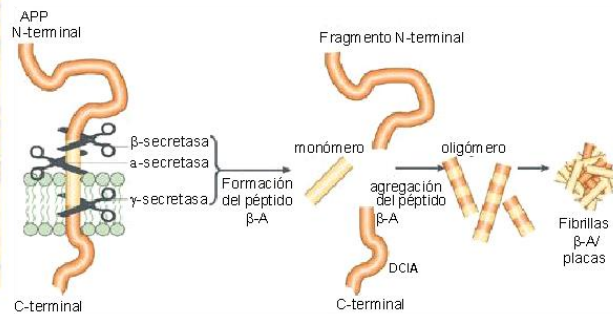


Figura 1. Lesiones histológicas características de la enfermedad de Alzheimer. A, ovillos neurofibrilares compuestos por la proteína tau anormalmente fosforilada durante la EA. En condiciones normales la proteína tau se acumula en los axones y se asocia a los microtúbulos (MT) cumpliendo una función estabilizadora, sin embargo, bajo condiciones patológicas como la EA y otras tauopatías, es hiperfosforilada en múltiples sitios lo que determina su disociación de los microtúbulos y su deposición. B, placas amiloides formadas por agregados insolubles de $A\beta$. En condiciones patológicas la proteína precursora amiloide (APP) es cortada por las enzimas β -secretasa y γ -secretasa generando el $A\beta$ de 40-42 aminoácidos de longitud, el cual tiene la potencialidad de agregarse y formar agregados tóxicos insolubles como fibrillas y placas. Modificado de Gotz y Ittner 2008. y

1.2 Procesamiento de la APP, generación del péptido β -Amiloide

El $A\beta$, principal constituyente de las placas amiloides, es producido a partir del procesamiento de la proteína precursora del amiloide, APP (*Amyloid Precursor Protein*) (4). La APP es una proteína de transmembrana expresada en un gran número (N°) de tejidos que cumple diversos roles en la regulación de importantes funciones celulares especialmente en el sistema nervioso central, particularmente como molécula de adhesión, como factor de crecimiento y como señal que mantiene la actividad neuronal (7). Durante su procesamiento, la APP es objeto de cortes secuenciales llevados a cabo por complejos enzimáticos denominados: α -secretasa (perteneciente a la familia de proteínas ADAM, *A Disintegrin And Metalloproteinase family enzyme*), β -secretasas (denominadas BACE 1, *β -site APP-Cleaving Enzyme 1*) y γ -secretasas (grupo de enzimas compuestas de presenilina 1 y 2) (8). Estas enzimas cortan la APP generando dos vías de procesamiento, una vía amiloidogénica y una vía no amiloidogénica (4) (Figura 2). La APP es mayoritariamente procesada por la vía no amiloidogénica y la fracción restante de moléculas de APP son sustrato para la vía amiloidogénica. La mayor parte del $A\beta$ producido es de 40 residuos aminoacídicos ($A\beta_{40}$), mientras que una pequeña fracción (~10 %) corresponde a una variante de 42 residuos ($A\beta_{42}$). Esta variante $A\beta_{42}$ es más hidrofóbica y más propensa a formar fibrillas (4). La individualización de familias con antecedentes de presentar la EA permitió la identificación de diversas mutaciones en los genes *APP*, *PSEN1* y *PSEN2*, las cuales afectan el metabolismo y estabilidad del péptido β -A (9,10,4,11,8). La primera causa genética identificada en familias con EA fue la presencia de mutaciones en el gen que codifica la APP, basados en la observación de que pacientes con síndrome de Down que llevan una copia extra del cromosoma 21 (trisomía 21) presentan una ocurrencia prematura de neuropatología relacionada con la EA (9,4). Desde entonces se han identificado numerosas mutaciones en el gen de la APP (Figura 2), como la denominada “*London mutation*”, la primera mutación identificada (12) o la “*Swedish mutation*” (APP_{Swe}), que corresponde a una doble sustitución aminoacídica que lleva a una sobreproducción del $A\beta$ por medio de la vía β secretasa (10,4,11,8).

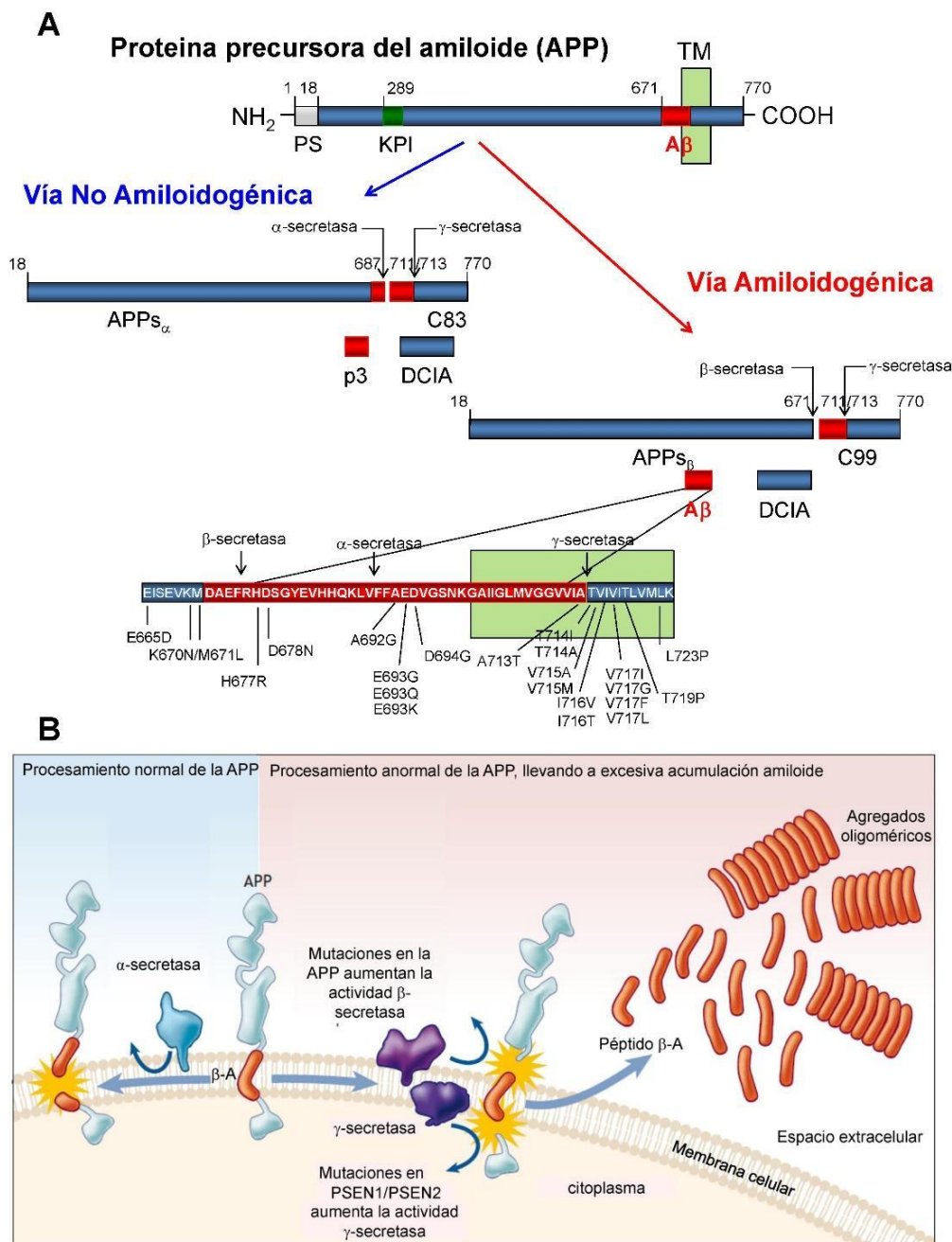


Figura 2. Diagrama esquemático de la APP y su procesamiento. A, El Aβ se origina a partir de la proteólisis de la APP, una proteína de transmembrana que contiene de 695-770 residuos aminoacídicos. La APP presenta un péptido señal (PS) en su extremo NH₂ terminal de 17 aminoácidos (aac.), un dominio inhibidor de serina proteasas del tipo Kunitz (KPI) y un único dominio que atraviesa la membrana (TM) entre los aac. 700-723. La APP sufre procesamiento proteolítico secuencial a través de dos vías. La APP es procesada predominantemente a través de la vía no amiloidogénica, la cual impide la formación del Aβ. El primer corte enzimático es mediado por la enzima α-secretasa, dentro de la región del Aβ por tanto previniendo su formación. Dos fragmentos son liberados, un gran

ectodominio soluble (APP_{sa}) y un fragmento más pequeño carboxi terminal de 83 residuos aac. (C83) que queda retenido en la membrana. Adicionalmente el fragmento C83 puede sufrir un posterior corte mediado por la γ -secretasa generando el péptido p3. La segunda vía de procesamiento corresponde a la vía amiloidogénica que lleva a la formación del $A\beta$. En esta vía la proteólisis inicial es llevada a cabo por la β -secretasa, generando la secreción de un fragmento soluble ligeramente truncado ($sAPP\beta$) y dejando un fragmento de 99 aac. en la membrana (C99). Posteriormente este fragmento C99 es cortado dentro de los 38-43 aac. desde su extremo NH_2 por el complejo enzimático γ -secretasa generando el $A\beta$. Este corte produce predominantemente $A\beta_{40}$, y el más amiloidogénico $A\beta_{42}$ a una razón de 10:1. DCIA, dominio citoplasmático intracelular de la APP. Los cortes de las enzimas α -, β -, γ -secretasas son indicados con flechas. Las mutaciones para la APP asociadas a la EA familiar son: K670N/M671L (Swedish mutation), A692G (Flemish mutation), E693G (Arctic mutation), E693Q (Dutch mutation), T741I (Austrian mutation), V715M (French mutation), I716V (Florida mutation), V717I y V717G (London mutation), V717F y V717L (Indiana mutation) y L723P (Australian mutation). (Modificado de Selkoe, 2001). B, Dibujo del procesamiento de la APP en la membrana celular, las mutaciones en la APP favorecen la producción de β -A al aumentar la actividad de la β -secretasa. Por su parte las mutaciones en PSEN1/PSEN2 aumentan la actividad de la γ -secretasa. A, Ala; C, Cys; D, Asp; E, Glu; F, Phe; G, Gly; H, His; I, Ile; K, Lys; L, Leu; M, Met; N, Asn; P, Pro; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val; W, Trp; Y, Tyr. (Modificado de Goedert y Spillantini 2006; Patterson y col. 2008).

Otras mutaciones tales como “Arctic mutation” (APP_{Arctic}) o la “Dutch mutation” aumentan la agregación del $A\beta$, llevando a una forma agresiva y de temprano inicio de la EA y a una demencia vascular con hemorragias cerebrovasculares respectivamente (10,8). Mutaciones en los genes *PSEN1* (cromosoma 14) y *PSEN2* (cromosoma 1) influyen al metabolismo de la APP promoviendo la producción del altamente amiloidogénico $A\beta_{42}$, aumentando la actividad γ -secretasa (13,8).

Mientras las mutaciones autosómicas dominantes en la APP son causas poco frecuentes de la EA, la presencia del alelo E4 de la apolipoproteína E (ApoE) en el cromosoma 19, constituye el mayor factor de riesgo genético asociado a familias con EA de inicio tardío (10, 4). En este sentido la presencia de la proteína ApoE4 ayuda a acelerar la enfermedad principalmente en pacientes mayores de 60 años y es el principal factor de predisposición de la enfermedad en humanos (10). También hay evidencia de que la presencia del alelo E2 confiere protección contra el desarrollo de la enfermedad (4).

Para entender los mecanismos de formación de placas y agregación del $A\beta$, se ha hecho necesaria la búsqueda de modelos animales que repliquen los rasgos de la EA. Es así como

se han desarrollado animales transgénicos, los cuales llevan las mutaciones asociadas a la forma familiar de esta enfermedad. A la fecha se han descrito alrededor de 59 ratones transgénicos relacionados al gen APP, 17 ratones relacionados al gen PSEN1 y 6 ratones relacionados al gen PSEN2 (14). Estos modelos han sido de gran utilidad para estudios farmacológicos dirigidos a retardar la formación de placas o incluso remover las placas existentes, analizar los efectos del A β sobre la plasticidad sináptica y sobre algunos paradigmas conductuales como una aproximación a los efectos sobre la función cognitiva. Sin duda tales modelos han constituido una valiosa herramienta para el estudio de esta enfermedad. Uno de estos modelos es el ratón APP/PS1, el cual expresa la mutación *swedish* en el gen APP y una delección en el exón 9 del gen PSEN1 (15).

1.3 Hipótesis amiloide

El descubrimiento del A β como principal constituyente de las placas amiloides centró la atención en el rol de este péptido en la fisiopatología de la EA. Esto llevó a la formulación de la teoría más aceptada sobre la etiología y patogénesis de la EA, la hipótesis amiloide. Esta hipótesis establece esencialmente que la sobreproducción del A β junto con la reducción en su degradación lleva a una serie de fenómenos desde la oligomerización del A β hasta la gradual deposición amiloide, lo que trae como consecuencia la formación de ovillos neurofibrilares (5) y posteriormente falla sináptica, daño neuronal y la alteración en la memoria (16, 5) (Figura 3). Por tanto, de acuerdo con esta hipótesis, la deposición del amiloide precedería a la formación de ovillos. Diversas evidencias soportan esta hipótesis. En primer lugar, la identificación del A β como principal constituyente de las placas amiloides en individuos con Síndrome de Down (Trisomía 21) y pacientes con la EA, y junto con ello la observación de que individuos con Síndrome de Down padecen de signos neuropatológicos asociados a la EA (17–19). En segundo lugar, la evidencia aportada por los modelos animales transgénicos que expresan mutaciones relacionadas con la forma familiar de la EA muestran un aumentado procesamiento proteolítico de la APP, sobreexpresan el A β , desarrollan oligómeros y placas amiloides y muestran funcionamientos cognitivos alterados medidos a

través de diversas pruebas conductuales (20–23). En particular, la generación de un ratón transgénico que lleva mutaciones en los genes *APP* y *PSEN1* (EA Familiar) junto con una mutación en el gen tau, muestran patología amiloide antes de la formación de ovillos (24). Otras evidencias obtenidas en animales normales tratados con oligómeros del A β extraídos de pacientes con EA muestran tanto funcionamiento conductual como mecanismos de plasticidad alterados (25–27).

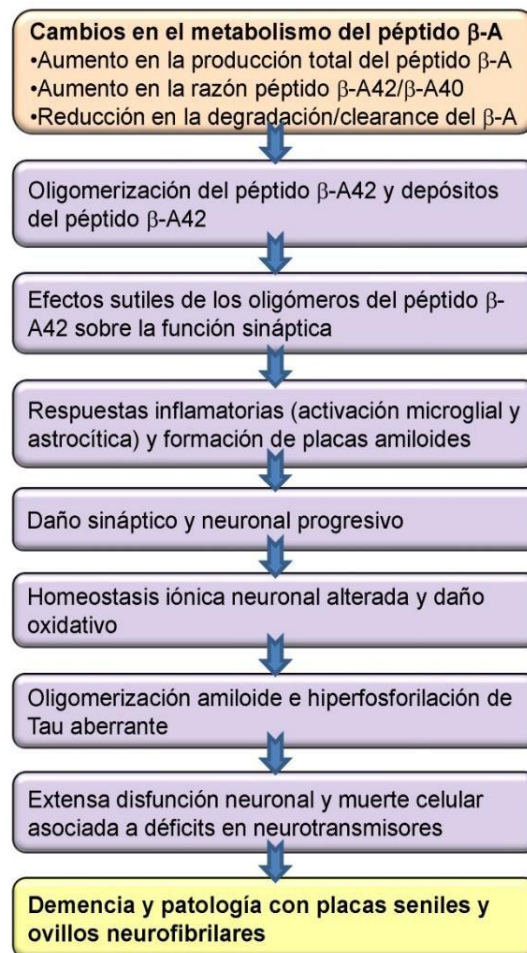


Figura 3. Hipótesis amiloide. Secuencia hipotética de eventos patogénicos que llevan a la EA. Modificado de Haass y Selkoe 2007.

Las manifestaciones clínicas de la EA son el resultado de cambios y modificaciones en el cerebro de las personas que padecen este mal, y se caracterizan por la presencia de placas amiloides y ovillos neurofibrilares, degeneración neuronal, pérdida de sinapsis y disminución en los niveles de ciertos neurotransmisores en regiones cerebrales involucradas en la memoria (16). Ha sido difícil establecer cuál de todas las formas del A β encontradas en el cerebro de pacientes con EA induce los cambios neuropatológicos y los síntomas neurológicos que caracterizan la enfermedad.

Originalmente se postuló que la aparición de placas con formas insolubles del A β era responsable de gatillar la enfermedad y explicaba por tanto las alteraciones en la memoria. Sin embargo, ha sido complicado establecer una correlación entre la aparición de placas y el temprano déficit cognitivo observado, y podrían corresponder a una etapa más avanzada de la enfermedad. Adicionalmente, la presencia de placas amiloides en el cerebro de individuos no dementes puso en duda la responsabilidad de las placas en la patogénesis de la enfermedad (28). Incluso, hay quienes piensan que las placas amiloides serían una consecuencia frente a otro evento patogénico y cumplirían un rol más bien protector frente al daño neuronal (29).

Además, estudios con animales transgénicos para la EA han evidenciado que los cambios patológicos (cognitivos y sinápticos) ocurren antes del inicio de la deposición amiloide (30,31). Por otro lado, varios tipos de ensamblajes del A β han sido descritos, incluyendo protofibrillas, estructuras anulares, paranúcleos, ligandos difusibles derivados del A β (también conocidos como ADDLs), globulómeros y fibrillas amiloides (32,33). Algunos de estos ensamblajes corresponden a formas oligoméricas solubles, los cuales posteriormente pueden adoptar una configuración fibrilar volviéndose insolubles (33).

Un gran cuerpo de evidencia implica la participación de oligómeros solubles en el temprano declive cognitivo soportando un rol patogénico para estas estructuras en el desarrollo de la EA (32,34,35), aun cuando también existe evidencia para un rol patogénico de las placas amiloides en el daño cognitivo asociado a la EA (36,37).

Diversos estudios demuestran que la presencia del A β desencadena una importante astrogliosis, un aumento anormal de astrocitos. Cabe destacar una investigación realizada con cultivos primarios de neuronas y glías (38), incubados con el A β , en donde se desencadenó una cascada inflamatoria, con sobreactivación en cadena de microglías,

astrocitos (astrogliosis) y neuronas. Lo anterior trajo como consecuencia la sobreactivación de canales como Panexina 1 (Panx1) y una alta tasa de muerte neuronal, la cual disminuyó al agregar a estos cultivos Probenecid (PBN), un bloqueador de los canales de Panx1.

Panx1 es una proteína de membrana que forma canales no selectivos, estructuralmente similares a los hemicanales de unión gap (Figura 4). Son permeables a iones, nucleótidos y otras moléculas pequeñas por debajo de 900 Da (39).

La actividad de Panx1 ha sido implicada en la señalización paracrina, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (40) y la regulación inflamatoria. Estudios recientes en diferentes modelos animales demostraron que la sobreactivación de Panx1 se correlaciona con una desaparición selectiva de varios tipos de neuronas. La lista de activadores de Panx1 incluye ATP extracelular, glutamato, alto K^+ , Zn^{2+} , factores de crecimiento de fibroblastos, citocinas proinflamatorias y elevación de Ca^{2+} intracelular. La mayoría de estas moléculas se liberan después de una lesión mecánica, isquémica o inflamatoria del sistema nervioso central (SNC) y activan rápidamente el canal Panx1. (41). A diferencia de las conexinas, que están cerradas a concentraciones de Ca^{2+} extracelular a nivel fisiológico (42), las panexinas permanecen abiertas y pueden pasar Ca^{2+} extracelular a través de la membrana plasmática.

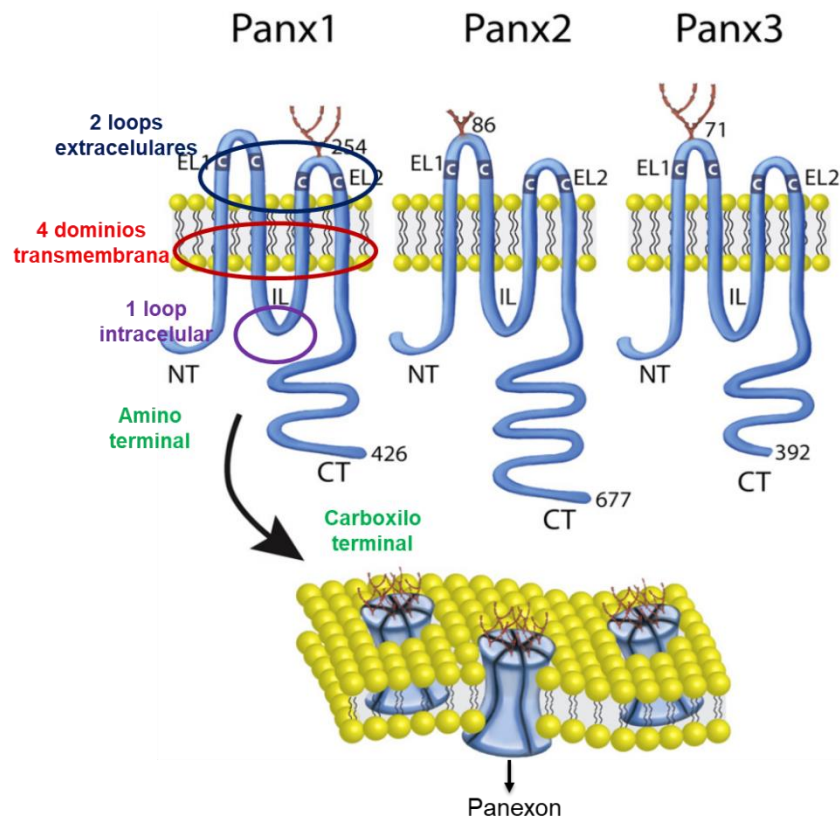


Figura 4. Topología de membrana de los tres miembros de la familia de Panexinas y formación de panexones. Las panexinas son proteínas con cuatro dominios de transmembrana, tienen dos asas extracelulares (EL1- EL2), además de un asa intracelular (IL), amino terminal (NT) y carboxilo terminal (CT). Un canal o panexón está formado por 6 unidades de panexinas (43).

1.4 Enfermedad de Alzheimer, morfología neuronal y sinapsis

Las neuronas son células especializadas cuya morfología polarizada les permite procesar información (44). Presentan un árbol dendrítico altamente complejo y ramificado, crucial para recibir diversos contactos provenientes de otras neuronas, estableciendo sinapsis, y así integrar múltiple información que será transmitida desde el soma a través del axón

codificada en señales eléctricas para continuar con su transmisión (44). Las sinapsis son estructuras esenciales para la comunicación neuronal, compuestas por un compartimento presináptico, que contiene la maquinaria para la liberación de neurotransmisor, y un compartimento postsináptico, formado por la maquinaria que detecta los neurotransmisores y transduce las señales activadas por éstos (45). La pérdida de sinapsis es el signo que se relaciona más fuertemente con el déficit cognitivo (6). Hoy en día, abundante evidencia indica que la presencia de $\text{osA}\beta$ en el cerebro y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con EA (46–48) son responsables del declive temprano en la memoria (34,49). Estos antecedentes han sido avalados en modelos animales para esta enfermedad, donde se ha evidenciado que los $\text{osA}\beta$ ejercen una amplia variedad de efectos nocivos sobre las sinapsis (50) antes de que la neurodegeneración sea evidente (32,35,51,52). De hecho, se ha demostrado que los $\text{osA}\beta$ se unen preferentemente a las sinapsis (53), donde interactúan con una amplia gama de objetivos sinápticos, como la proteína priónica (54), receptores nicotínicos de acetilcolina $\alpha 7$, transportadores de glutamato (52), receptores de insulina (55), receptores ionotrópicos de glutamato del tipo NMDA (NMDAR) (56) y receptores metabotrópicos de glutamato del tipo mGluR5 (57,58), explicando su preferencia por estas estructuras. Esta unión con receptores sinápticos determina una serie de modificaciones en la actividad de estos receptores y en consecuencia en la funcionalidad de las sinapsis (59). Por ejemplo, se ha observado que los $\text{osA}\beta$ inducen alteraciones en la función y expresión de NMDAR, como su sobreactivación, donde en consecuencia a la exposición de concentraciones elevadas de glutamato, se produce una entrada masiva de Ca^{2+} , aumentando los niveles de Ca^{2+} intracelular, lo cual desencadena el mecanismo de muerte celular conocido como excitotoxicidad (60,61). Estas alteraciones, afectan a su vez los mecanismos de plasticidad sináptica (PS), un conjunto de mecanismos de modificaciones en la actividad sináptica que se piensan son los mecanismos celulares que explican la memoria y el aprendizaje (62). Estos cambios en la actividad sináptica se acompañan a su vez con modificaciones en la estructura sináptica, particularmente en las espinas dendríticas, las cuales son estructuras especializadas de la membrana dendrítica que contienen la maquinaria proteica (receptores y proteínas de señalización) que soportan esta comunicación (63). En este contexto, se ha observado que los $\text{osA}\beta$ pueden alterar por un lado la estabilidad y el tráfico de receptores de glutamato en la membrana sináptica (64,65), y por otro lado el

citoesqueleto neurítico, modificando de esta manera la morfología dendrítica y la estructura y composición de las espinas dendríticas (53,66–68), sitios preferentes de formación de las sinapsis excitatorias (69).

Recientemente se ha propuesto que la interacción entre el NMDAR, el canal de Panx1 y la familia de quinasas Src, determina una señalización metabotrópica la cual es esencial para el desarrollo de la respuesta excitotóxica frente a condiciones de isquemia y daño cerebrovascular (70). En este contexto, se ha observado que, bajo condiciones isquémicas, los canales de Panx1 se abren por activación del NMDAR (71), y la sobreactivación de los NMDARs desencadena una actividad neuronal exacerbada que puede ser inhibida por el bloqueo de los canales de Panx1 (72), soportando adicionalmente una asociación entre el canal de Panx1 y el NMDAR en condiciones patológicas. Estudios posteriores han mostrado que el tratamiento de rebanadas de hipocampo de ratón con $\text{osA}\beta$, induce la muerte neuronal a través de un aumento en el tráfico y actividad de canales de Panx1 en neuronas, sugiriendo una asociación entre canales de Panx1 y $\text{osA}\beta$ (38).

En un estudio realizado en nuestro laboratorio sobre un modelo Knock-Out (KO) de Panx1, cuyo manuscrito se encuentra aún en preparación, se observaron modificaciones a nivel del citoesqueleto de actina con la consecuente modificación en la morfología dendrítica y de las espinas dendríticas. Esto sugiere que los procesos dependientes del citoesqueleto neuronal que median la actividad y estructura neuronal pueden ser modulados por la Panx1. En este sentido, existe evidencia de que los $\text{osA}\beta$ afecta los procesos dependientes del citoesqueleto neuronal tal como la morfología de las espinas dendríticas (68) y antecedentes de nuestro laboratorio, que aún no son publicados, sugieren que el bloqueo de Panx1 puede mitigar estos efectos.

1.5 Enfermedad de Alzheimer y memoria

La fase inicial de la EA se caracteriza por un progresivo deterioro en la memoria episódica o declarativa (73,74). La memoria declarativa se refiere a la capacidad de recordar

conscientemente hechos y eventos, y depende de la integridad del lóbulo temporal medial, el cual comprende el hipocampo, el giro dentado, el complejo subicular, junto con las cortezas entorrinal, perirrinal y parahipocampal (75,76).

Recientemente se ha observado en modelos transgénicos para la EA, un deterioro progresivo en tareas conductuales que evalúan la capacidad cognitiva antes de la deposición amiloide (35,77). Al respecto se ha propuesto que la acumulación de osA β ocurriría temporalmente en etapas tempranas del desarrollo patológico en modelos animales y probablemente también durante el deterioro cognitivo leve en humanos (6,78–81). En concordancia con esta hipótesis, se ha encontrado que la inyección de osA β derivados de líneas celulares en ratas normales induce alteraciones en la función cognitiva (82,83).

Otros estudios han descrito que la ausencia de los canales formados por Panx1 modifica la inducción de PS y modula la memoria hipocampal (84–86) los cuales van en la dirección de cambio contrario a lo observado en modelos para la enfermedad de Alzheimer (86). Más aún, se ha evidenciado que la ausencia de esta proteína determina modificaciones a nivel del citoesqueleto de actina con la consecuente modificación en la morfología dendrítica y de las espinas dendríticas (87). Considerando que las espinas dendríticas son estructuras enriquecidas en actina, que su morfología depende de las dinámicas del citoesqueleto de actina, y que alteraciones en ella determinan perturbaciones en la PS y la memoria, entonces cabe preguntarse si los canales de Panx1 pueden estar relacionados con las alteraciones morfológicas en dendritas y espinas dendríticas producidas por los osA β . Por ello, es importante conocer si el bloqueo farmacológico de los canales de Panx1 afecta los mecanismos patológicos de los osA β sobre la morfología neuronal y dendrítica.

PBN es un fármaco aprobado clínicamente que se utiliza, desde hace muchos años, principalmente para el tratamiento de la gota y la hiperuricemia con un perfil limitado de efectos adversos (88). La intención inicial de este medicamento fue ser usado en tratamientos de cuadros infecciosos con antibióticos derivados de la penicilina, permitiendo una mayor disponibilidad de los antibióticos en la circulación y así disminuir o retardar la excreción renal de la penicilina (89). Además, se ha demostrado su especificidad por canales formados por Panx, inhibiéndolos selectivamente. Sin embargo, no está claro cómo PBN accede y afecta a este canal, aunque puede actuar a través de interacciones con el dominio hidrofílico

de la proteína o acceder al canal a través de la bicapa lipídica (90). En un estudio preliminar (91), se analizaron aspectos neurodegenerativos en hipocampos de rata tras ser inyectadas con A β intrahipocampal y tratadas con distintos fármacos inyectados vía intraperitoneal, incluido PBN (aunque utilizado para mantener los niveles de otros fármacos en circulación), donde se observó que la administración de PBN por sí sola produjo una disminución de células degeneradas en comparación al control (sólo inyección intrahipocampal de A β) y una mayor cantidad de células viables, concluyendo que este fármaco tendría un efecto neuroprotector.

En base a lo anteriormente planteado, nos hemos propuesto analizar el efecto de PBN en las alteraciones morfológicas cerebrales, así como en la cognición, en un modelo murino de EA, bloqueando con este fármaco los canales de Panx1.

CAPÍTULO 2. PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA

2.1 Pregunta de investigación

¿El bloqueo farmacológico de Panx1 con PBN, podría atenuar las alteraciones cognitivas y morfológicas cerebrales inducidas por A β , en un modelo murino de EA?

2.2 Hipótesis

El fármaco PBN inhibe los canales de Panx1 disminuyendo las alteraciones, tanto cognitivas como morfológicas cerebrales, inducidas por A β en la EA.

2.3 Relevancia

Este proyecto se enmarca en la investigación básica con una potencial utilidad clínica, como una estrategia de innovación en salud, considerando que el entendimiento de los mecanismos de señalización mediados por los canales de Panx1 podrían dar luces de potenciales tratamientos farmacológicos para la EA, como el PBN que es un fármaco ya utilizado en humanos. Además, cabe destacar que la EA es una patología cada vez más relevante, debido al aumento progresivo de la población de adultos mayores tanto a nivel país como mundial.

CAPÍTULO 3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar los efectos del bloqueo farmacológico de Panx1, en las alteraciones cognitivas y morfológicas cerebrales, presentes en un modelo murino de la EA.

3.2 Objetivos específicos

- I. Determinar la función cognitiva de los ratones WT y APP/PS1, antes y después del tratamiento con PBN
- II. Describir la expresión de Panx1 en el cerebro de ratones WT y APP/PS1
- III. Comparar la expresión de Panx1 en el cerebro de ratones WT y APP/PS1
- IV. Comparar signos de neurodegeneración en el cerebro de ratones WT y APP/PS1 con y sin tratamiento con PBN
- V. Comparar la morfología y densidad dendrítica en el cerebro de ratones WT y APP/PS1 con y sin tratamiento con PBN

CAPÍTULO 4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Tipo de diseño

El diseño utilizado fue de tipo experimental, analítico y prospectivo.

-Experimental, ya que el investigador, ejerce máximo control de las variables con una metodología cuantitativa, en este caso con el uso de tratamiento farmacológico.

-Analítico, ya que su finalidad es evaluar una relación causal entre un factor de riesgo y un efecto (enfermedad).

-Prospectivo, ya que el inicio de la investigación es anterior a los hechos estudiados y los datos se recogen a medida que van sucediendo.

4.2 Descripción de la población de estudio

En este trabajo utilizamos dos cepas de ratones: el ratón silvestre C57bl/6 o WT (ratón control) y los ratones transgénicos APP^{swe}/PSEN1^{dE9} (APP/PS1 modelo de EA), machos y hembras de 18 meses de edad (ver anexo 1).

Todas las cepas de ratones fueron mantenidos en el bioterio de la Escuela de Medicina de la Universidad de Valparaíso. El cuidado y alimentación diaria de los animales estuvo bajo el cuidado del personal técnico del bioterio. Los animales fueron mantenidos en una habitación con temperatura controlada (21 +/- 2°C), en un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad, con alimento (*Prolab RMH 3000*) y agua *ad libitum*. Alternativamente la cepa transgénica APP/PS1 se obtuvo por donación del investigador Dr. Claudio Hetz provenientes del Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Después cumplir

el periodo de cuarentena, se trasladaron a la sala de mantención en donde se estableció una colonia de reproducción y expansión para su uso experimental.

Durante un mes, y previo al inicio de la fase experimental, dos grupos de animales (un grupo de 6 APP/PS1 y otro grupo de 4 WT) fueron mantenidos individualmente en jaulas de mantención, período en el cual fueron alimentados adicionalmente al alimento habitual con un gel para roedores (*Medigel sucralose; ClearH2O, Portland, ME, USA*) en el cual el primer grupo, tuvo el gel suplementado con el fármaco PBN (*P8761, Sigma Aldrich, MO, USA*) a una dosis de 100 mg/kg (ver anexo 2), y el segundo grupo sólo recibió un placebo, que es el mismo gel con el vehículo (VEH) en que fue preparado el PBN (ver anexo 2). Cada uno de estos animales recibió 4 ml de gel diario correspondiente a una de 10 porciones por sachet de gel.

Los animales fueron manipulados y procesados de acuerdo con el protocolo de manipulación animal aprobado por el comité de cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL) de la Universidad de Valparaíso (# BEA 064-2015).

4.3 Muestreo y tamaño muestral

El tipo de muestreo utilizado fue no probabilístico por conveniencia, debido a que seleccionamos un grupo de animales determinado de cada cepa, con las características de interés para nuestra investigación.

El tamaño muestral (n=10), se estimó considerando utilizar el menor N° de animales necesarios para obtener resultados estadísticamente significativos. Por otro lado, se utilizaron los mismos animales para la realización de diferentes tipos de evaluación experimental.

4.4 Variables

- De exposición:

- Presencia /ausencia de tratamiento con PBN

- De resultado:

- Neurodegeneración: Células viables/inviabiles (picnóticas y cariorréxicas)
- Arborización dendrítica, N° de intersecciones (ramificaciones) y longitud del árbol dendrítico
- Función cognitiva:
 - Distancia recorrida, N° de entradas a la periferia y centro del laberinto y distancia recorrida en la periferia y centro del laberinto en test *Open Field* (OF)
 - Tiempo de exploración en objeto nuevo (seg), con test de Memoria reconocimiento de objetos (MRO)
 - Latencia de escape (seg) y distancia recorrida (cm) con test de Memoria espacial (MWM)

4.5 Fuentes y método de recolección de datos

- Bitácora de registro diario de alimentación de animales con Medigel
- Microscopio óptico Leica DM500 implementado con cámara digital Leica ICC50W
- Microscopio confocal de barrido laser Nikon C1 Plus
- Cámara lúcida para realizar dibujos de tejidos con tinción de Golgi-Cox
- Software de análisis de imagen *Image J 1.6*
- Software de análisis y registro videos conductuales *AnyMaze*

4.6 Criterios de inclusión y exclusión

4.6.1 Criterios de inclusión:

- Animales de 18 meses de edad
- Animales de la cepa C57BL/6J o transgénico APPswePS1Δ9
- Animales con un peso aproximado de 40gr
- Animales de apariencia y comportamiento normal (sin presencia de *barbering*)
- Animales que muestren una óptima realización del test OF, donde se evalúa la movilidad del animal por el centro del laberinto y el tiempo en que permanece en la periferia

4.6.2 Criterios de exclusión:

- Animales heterocigotos
- Animales con evidentes signos de daño físico
- Animales con problemas de desplazamiento o ansiedad, medidos por OF (los animales no presentan desplazamiento).

4.7 Estudios conductuales

Todos los animales se sometieron a estudios conductuales previo a su tratamiento con el gel suplementado con PBN o VEH, según corresponda, para evaluar su función cognitiva y locomotora.

Luego del término de estos estudios, un grupo de animales (3 APP/PS1 y 2 WT) (ver anexo1) fue alimentado con un gel suplementado con el bloqueador de Panx1 PBN (a una concentración de 100 mg/Kg), y otro grupo (3 APP/PS1 y 2 WT) que se alimentó sólo con el gel con el VEH utilizado para preparar el PBN (20 mM NaOH), durante 4 semanas.

Luego de cumplir el tiempo de administración de PBN, se les realizó a los animales nuevamente la misma caracterización conductual mediante las pruebas de OF y MRO, para evaluar algunos tipos de memoria que se afectan en el ratón APP/PS1.

Todos los test conductuales fueron realizados en una pieza acondicionada para ello, con T° (21° +/- 2°C), con un ruido blanco (50 dB) y luminosidad regulada (200 lux).

4.7.1 Test Open Field

Esta prueba se realizó para analizar la actividad locomotora de los animales. Para realizarla se utilizó una caja cuadrada de acrílico blanco de 50 cm × 40 cm × 63 cm. La prueba se realizó durante 3 días seguidos, con una sesión diaria en la cual los ratones exploran la superficie completa por 5 minutos, registrándose con una cámara de video (Figura 5).

Se analizaron los siguientes parámetros: a) distancia total de exploración; b) distancia recorrida en la periferia y centro del laberinto y c) N° de entradas a la periferia y centro del laberinto. El análisis de los videos fue realizado con el programa *Any Maze*.

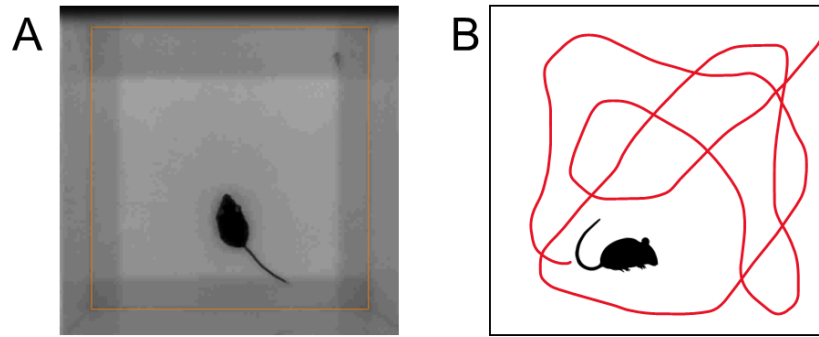


Figura 5: *Laberintos utilizados en la caracterización conductual de OF. A, Laberinto utilizado para la prueba donde se muestra al animal recorriéndolo. B, Diagramas representativos de la prueba y su recorrido*

4.7.2 Memoria de Reconocimiento de Objetos

Esta prueba permite analizar el nivel de exploración preferencial de objetos nuevos observada en los roedores (92). Se realizó utilizando la misma caja de la prueba anterior, con la diferencia de que además se utilizaron objetos de cerámica, vidrio y plástico de diferentes formas (Figura 6).

La prueba se aplicó durante 2 días seguidos, con una única sesión diaria, la que consiste en tres fases: (i) Fase de familiarización, en donde los animales exploran durante 5 minutos dos objetos idénticos; ii) Fase de retención, donde los animales son removidos de la caja por 1 hr, la caja es limpiada, y los objetos limpiados y cambiados por un objeto nuevo y una copia extra de los objetos idénticos de la fase (i) (en adelante objeto familiar) y (iii) Fase de reconocimiento, donde los animales exploran durante 5 minutos el objeto nuevo y el objeto familiar (Figura 6).

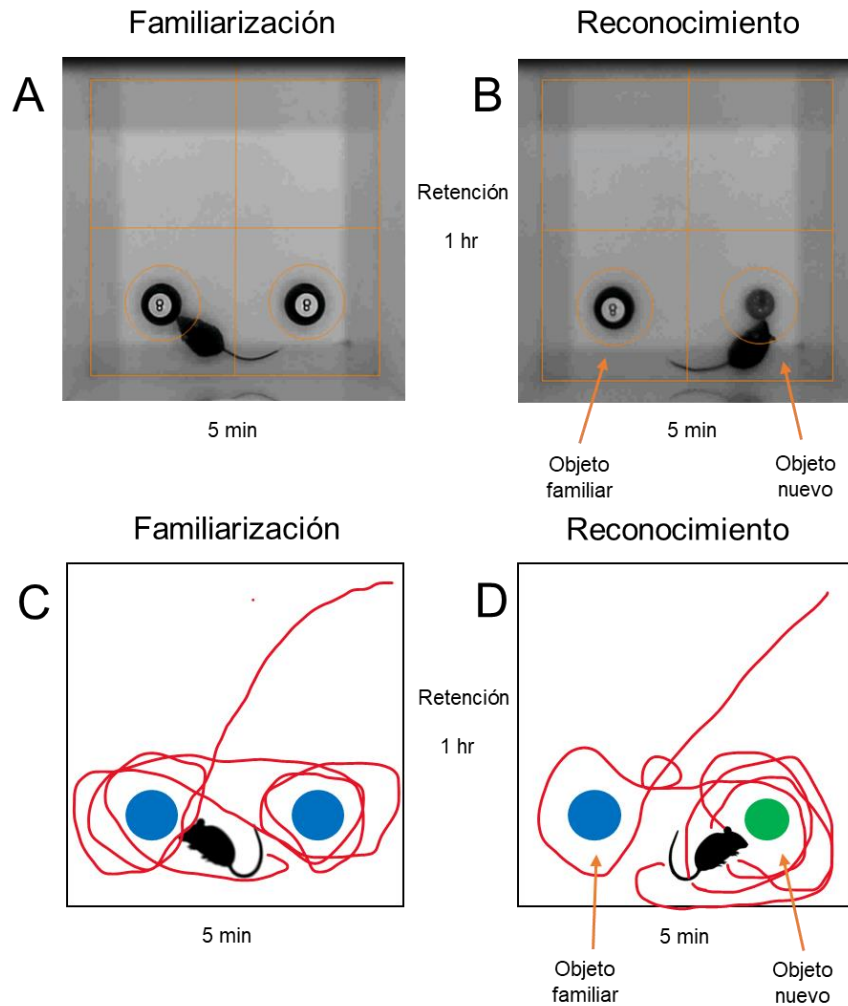


Figura 6: Laberintos utilizados en la caracterización conductual de MRO. *A*, Laberinto utilizado para la prueba de MRO donde se muestra la fase de familiarización con los objetos idénticos. *B*, Laberinto utilizado para la prueba de MRO donde se muestra la fase de reconocimiento con un objeto idéntico a la fase anterior y un objeto nuevo. *C-D*, Diagramas representativos de cada una de las fases junto a sus recorridos.

Para determinar la memoria de reconocimiento de objetos, se estimó un Índice de Preferencia (IP) que corresponde a:

$$IP = \frac{\text{tiempo de exploración del objeto nuevo}}{\text{tiempo de exploración total}} \times 100$$

donde, tiempo de exploración total corresponde a la suma de los tiempos de exploración para los objetos nuevo y familiar en la fase de exploración. También se estimó la latencia a la primera visita al objeto nuevo y el N° total de visitas.

Luego de terminada cada sesión y durante la Fase de retención, los objetos y la caja son limpiados con etanol 70%. La ubicación de los objetos fue determinada pseudoazarosamente.

4.7.3 Laberinto acuático de Morris

Esta prueba se realizó para evaluar la memoria espacial de los ratones. Se utilizó una piscina circular de 120 cm de diámetro y 60 cm de altura, la que posee claves visuo-espaciales de color negro, de formas (triángulo, cuadrado, círculo y cruz) y localizaciones fijas equidistantes (cuatro puntos cardinales), distribuidas en 4 cuadrantes. La piscina contiene en su interior una plataforma circular acrílica de superficie rugosa de 12-15 cm de diámetro y 90 cm de alto, la que se ubicó entre las claves cuadrado y cruz.

El primer día de experimento consiste en una fase de habituación, en donde todos los animales fueron introducidos en la piscina mirando hacia la pared y desde la posición opuesta a la que se encontró más adelante la plataforma. Durante este tiempo, los animales nadaron libremente durante 1 minuto, se familiarizaron con la piscina y reconocieron los espacios y las claves visuo-espaciales presentes, sin embargo, en esta fase de habituación aún no se introdujo la plataforma al interior de la piscina.

El segundo día de experimento consiste en un pre-entrenamiento de los animales, en el cual se introdujeron a la piscina mirando hacia la pared, pero esta vez desde una posición aleatoria, exceptuando el cuadrante en donde se encuentra la plataforma. Durante este pre-entrenamiento se introdujo la plataforma en el cuadrante preestablecido y se dejó visible 1 cm sobre la superficie del agua. Los animales nadaron por 1 minuto, tiempo durante el que debían encontrar la plataforma y subirse a ella para salir del agua y estar a salvo. En caso de

que durante ese tiempo no encontraran la plataforma, se les guiaba hacia ella, tomándoles desde la base de la cola, con el objetivo de que encontraran la plataforma y conocieran su posición en la piscina. Una vez sobre la plataforma, los ratones permanecieron 15 segundos y después se llevaron a su caja a descansar durante 1 minuto. Este procedimiento se repitió dos veces.

Durante los días tres, cuatro, cinco y seis, se realizó el entrenamiento de los ratones, en el cual se introdujeron a la piscina mirando hacia la pared, desde una posición aleatoria, exceptuando el cuadrante en donde se encontraba la plataforma. Durante el entrenamiento se introdujo la plataforma en el cuadrante preestablecido, sin embargo, no era visible, puesto que se encuentra sumergida 1 cm. Para evitar que los ratones vieran la plataforma, se pintó el agua de color blanco, de modo que pudieran nadar a ella sólo recordando las claves visuo-espaciales. Cada uno de los 4 días de entrenamiento consistieron en tres bloques de 1 minutos cada uno, separados con un lapso de 15 minutos cada uno. Durante cada bloque los animales permanecieron 1 minuto nadando dentro del agua, otro minuto descansando en una caja fuera del agua y el tercer minuto dentro del agua nadando nuevamente.

Finalmente, el séptimo y último día de experimento se realizó la prueba definitiva, la que consistía en introducir al animal a la piscina, mirando hacia la pared, desde el cuadrante opuesto al que se encontraba anteriormente la plataforma. Esta prueba tuvo una duración de 1 minuto y no se introdujo la plataforma, con el objetivo de que el animal nadara hacia el lugar en que debería haber estado la plataforma, midiéndose el tiempo que pasara en ese cuadrante. (Figura 7)

Todas las evaluaciones son registradas por videos.

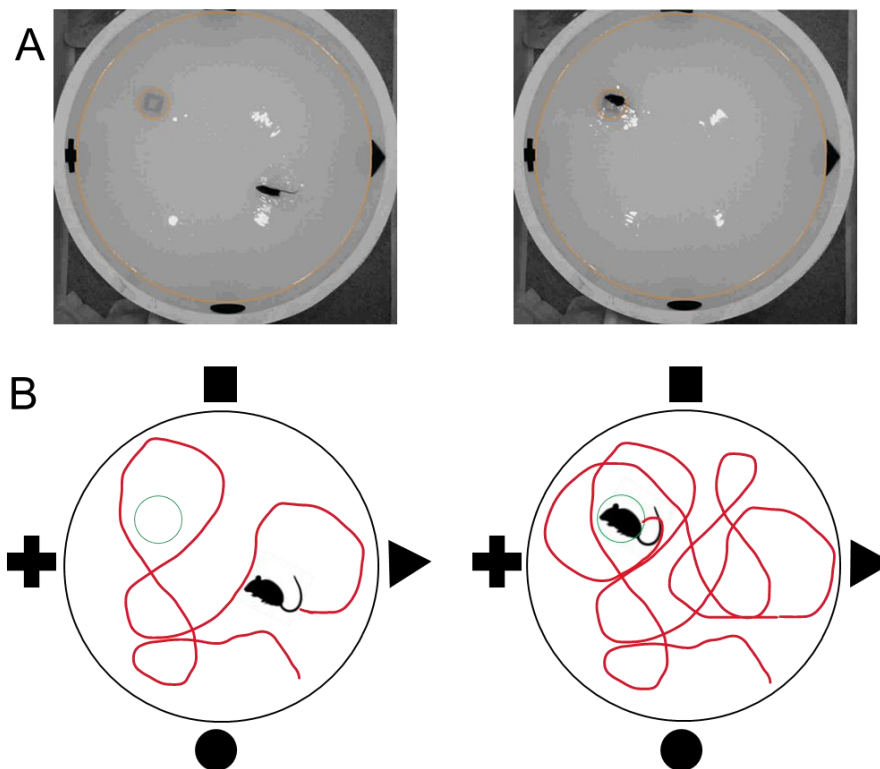


Figura 7. Laberintos utilizados en la caracterización conductual de MWM. **A**, Laberinto utilizado para la prueba donde se muestra al animal recorriendo la piscina y cuando llega a la plataforma. **B**, Diagramas representativos de la prueba y su recorrido.

4.8 Estudios histológicos

Las técnicas histológicas son el conjunto de procedimientos a los que se somete un tejido biológico, a fin de que sea posible su estudio por medio del microscopio, posibilitando la observación de las estructuras no visibles al ojo humano.

Después de realizar los estudios conductuales, los mismos animales fueron sacrificados y procesados para realizar los estudios morfológicos. Se utilizó un hemisferio de cada animal para realizar diversas técnicas, los cuales fueron seccionados en una matriz de corte para

separar el bulbo olfatorio y el cerebelo del hipocampo, que es nuestra zona de interés. Sólo en la técnica de Golgi Cox utilizamos el hemisferio completo sin seccionar. A continuación, se detallan las técnicas y sus procedimientos.

4.8.1 Técnica de Hematoxilina-Eosina

Para realizar un estudio general de la histología cerebral de los animales WT y APP/PS1, antes y después del tratamiento con PBN, se realizó la tinción de Hematoxilina-Eosina.

Los animales se anestesiaron con Isoflurano (en la fase de inducción 2-2,5% y durante la mantención 1-2% y luego perfundidos intracardialmente con 30 ml de solución de lavado (NaCl 0,9%). Posteriormente los cerebros fueron removidos y fijados en un recipiente con paraformaldehído 4% en PBS 0,1 M (PFA 4%) durante 48 hrs para luego ser procesado e incluido en parafina (ver anexo 3). Posteriormente, los bloques de parafina fueron cortados a 7 μ m de grosor en un micrótomo marca Leitz.

Para realizar la técnica de rutina, los cortes se desparafinaron y rehidrataron en una batería de xiloles (10 min cada uno) y alcoholes de grados descendentes y posteriormente lavados en agua destilada (5 min cada uno). Se realizó tinción nuclear con hematoxilina de Harris por 30 seg y su viraje en agua corriente por 10 minutos. Se dejó en alcohol de 95% (5 min) para teñir con eosina alcohólica durante 4 seg. Finalmente se deshidrataron los cortes en alcoholes de grados ascendentes, se aclaró en xiloles (5 min cada uno) y se cubrieron con medio de montaje hidrofóbico (DePex, Serva 18243.02; ver anexo 4).

4.8.2 Técnica de Rojo Congo

La tinción de Rojo Congo es utilizada para la identificación de amiloide, que en este estudio nos permitió identificar las placas seniles características de la EA presente en los animales APP/PS1, antes y después del tratamiento con PBN.

Los animales fueron anestesiados con Isoflurano (en la fase de inducción 2-2,5% y durante la mantención 1-2% y luego perfundidos intracardialmente con 30 ml de solución de lavado (NaCl 0,9%). Posteriormente los cerebros fueron removidos y fijados en un recipiente con PFA 4% durante 48 hrs para luego ser procesados e incluidos en parafina (ver anexo 3). Posteriormente, los bloques de parafina se cortaron a 7 μ m de grosor.

Para realizar la técnica de Rojo Congo, los cortes fueron desparafinados y rehidratados en una batería de xiloles (10 min cada uno) y alcoholes de grados descendentes y posteriormente lavados en agua destilada (5 min cada uno). Se realizó la tinción con Rojo Congo al 5% por 5 min, para posteriormente diferenciar en KOH al 0.2% por 3 min. Luego se realizó un paso rápido por H₂O y se procede a contrastar con hematoxilina de Harris por 2 min, para finalizar, se deshidrataron rápidamente los cortes en alcoholes de grados ascendentes, se aclararon en xiloles (5 min cada uno) y se cubrieron con medio de montaje hidrofóbico (*DePex, Serva 18243.02*; ver anexo 6).

4.8.3 Técnica de Cresil violeta

Esta técnica es ampliamente utilizada en el estudio del sistema nervioso, permite visualizar con mayor detalle los somas neuronales, facilitando su análisis.

Primeramente, se anestesió al animal con Isoflurano (en la fase de inducción 2-2,5% y durante la mantención 1-2%) y luego fueron perfundidos intracardialmente con 30 ml de solución de lavado (NaCl 0,9%). Posteriormente los cerebros se removieron y fueron fijados en un recipiente con PFA 4% durante 48 hrs. para luego ser procesados e incluidos en

parafina (ver anexo 3). Se utilizaron cortes de 7 μm que luego se tiñeron mediante la técnica cresil violeta (ver anexo 7).

4.8.4 Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia

La inmunohistoquímica es una técnica que combina metodologías inmunológicas y bioquímicas para la detección de un antígeno celular o tisular, mediante el uso de un anticuerpo específico y un sistema marcador.

La inmunofluorescencia es una técnica para demostrar una variedad de antígenos presentes en células o tejidos utilizando anticuerpos marcados con fluorocromos, que al ser excitados emiten luz de longitud de onda visible.

Para los procedimientos se utilizaron cortes del tejido incluidos en parafina y los siguientes anticuerpos: anti-Panexina1 (1:200(IHQ) 1:100 (IF) Millipore, ABN242), anti-GFAP 2E1 (1:500 (IF) Santa Cruz, SC33673), Anti- β -Amiloide clon 6E10 (Inmunobiomédica, SIG-39320) (ver anexo 8).

4.8.5 Técnica de Golgi-Cox

La tinción de Golgi-Cox es un método clave para estudiar la morfología neuronal. Esta técnica permite el análisis de la morfología neuronal en especial la arborización dendrítica y espinas a través de la visualización de un mínimo de porcentaje (3%) de neuronas (93).

En primer lugar, se anestesió al animal con Isoflurano (en la fase de inducción 2-2,5% y durante la mantención 1-2%) para luego proceder a la perfusión sólo con suero salino (0,9%

de NaCl en H₂O_d). Posteriormente, el cerebro es extraído del animal. Se realizaron cortes gruesos por congelación (150 μ m) para luego ser teñidos utilizando la técnica de Golgi- Cox.

Para realizar la tinción y visualización de dendritas y espinas dendríticas, los cerebros de ratones WT y APP-PS1 fueron extraídos rápidamente y procesados utilizando el kit de tinción de Golgi-Cox (FD Rapid GolgiStain™, FD Neurotechnologies, Inc, PK401A) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cerebros fueron lavados con agua MilliQ para eliminar la sangre de la superficie. Luego fueron sumergidos en una solución de impregnación, mezclando volúmenes iguales de las soluciones A+B del kit, almacenados a temperatura ambiente durante 2 semanas en oscuridad, posteriormente traspasados a la solución C, y almacenados en oscuridad durante 72 horas. Transcurrido el tiempo de inmersión, los cerebros se cortaron en secciones de 100 μ m de grosor en un criostato a -25°C. A continuación, los cortes fueron lavados dos veces durante 4 minutos con agua MilliQ, traspasados a una solución D+E+agua MilliQ por 10 minutos, y después lavados dos veces con agua MilliQ. Posteriormente, los tejidos fueron deshidratados en etanol al 50%, 75%, 95% y 100% por 4 minutos, para finalmente ser lavados tres veces con xilol cada 4 minutos, y montados en portaobjetos para su posterior análisis (ver anexo 6).

4.9 Manejo y análisis estadístico de los datos

Se realizó un análisis de los estudios conductuales a partir de los videos grabados durante su realización mediante el software *AnyMaze* cuyos resultados serán expuestos mediante distintos tipos de gráficos.

Tras la realización de una inmunotinción con el anticuerpo anti-Panx1 describimos su patrón de expresión y las zonas específicas donde más se expresa esta proteína tras la visualización de las preparaciones por microscopía óptica.

Utilizamos un software de análisis de imagen (*Image J*), con el fin de cuantificar y posteriormente comparar el N° de neuronas piramidales viables v/s inviables, presentes en la

región CA1 del hipocampo mediante la realización de gráficos con los respectivos porcentajes de ambos tipos de células en relación con el total de células en un campo de $200\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ en distintas zonas de esta región.

Para analizar la morfología y densidad dendrítica realizamos el análisis de Sholl, que es un método que permite el estudio cuantitativo de la distribución radial de algunas propiedades del patrón de arborización dendrítica neuronal alrededor del soma de la célula. Este análisis de círculos concéntricos (intersección acumulativa) especifica la geometría dendrítica, las ramificaciones y los patrones de ramificaciones dendríticas. Este análisis consiste en la construcción de círculos concéntricos y equidistantemente organizados, que están centrados en el soma, en contar el N° de intersecciones de dendritas con los círculos a medida que aumenta el radio, en definir variables adecuadas utilizando el radio del círculo y el N° de intersecciones de dendritas con círculos de radios correspondientes y finalmente utilizar técnicas matemáticas apropiadas para el procesamiento y presentación de datos, como histogramas o gráficos en sistemas de coordenadas.

Los resultados de todos los análisis se expresaron como promedio \pm error estándar. La significancia estadística será determinada utilizando análisis de varianza (ANOVA), para los datos distribuidos normalmente. Posteriormente los datos serán analizados mediante un test de Bonferroni o el test de Tukey's para determinar diferencias dentro de los grupos. El análisis estadístico se realizará mediante el software *Prism 7.0* (Graphpad Software Inc, CA, USA).

4.10 Consideraciones éticas

Para todos los procedimientos de este estudio, se consideró el principio de No Maleficiencia.

Los animales de experimentación que se usaron, el ratón silvestre C57bl/6 (ratón control) y los ratones transgénicos APP^{swe}/PSEN1 Δ E9 (APP/PS1 modelo de enfermedad de Alzheimer), de 18 meses de edad, se obtuvieron del Bioterio de la Universidad de Valparaíso,

del cual está a cargo el Médico veterinario Enzo Seguel, ubicado en las dependencias del edificio Bruno Günther.

El personal certificado para el manejo de animales de experimentación mantuvo la supervisión diaria de los animales, proveyendo de la alimentación requerida y manteniendo el resguardo y salud de los animales. Dentro de las tareas diarias de supervisión se incluía el revisar que las condiciones de T° y humedad, los niveles de agua y comida sean las indicadas. En particular los animales alimentados con el gel acuoso suplementado con PBN, fueron pesados diariamente para controlar variaciones en el peso producto de la administración de PBN. La limpieza de las jaulas de mantención y el recambio de la arena de las jaulas fue realizada dos veces por semana.

Todo esto bajo las condiciones establecidas por el FAWC (*Farm Animal Welfare Committee*), conocidas como las 5 libertades, las que establecen que los animales no padezcan ni hambre ni sed, que no sufran malestar físico ni dolor, que no sufran heridas ni enfermedades, que puedan ajustarse a su comportamiento normal y esencial y que no sufran miedo ni angustia.

Además, se procurará en todos los casos, cumplir las normas ARRIVE del Centro nacional para el reemplazo, reducción y refinamiento de animales en experimentación (3Rs) de Inglaterra, formuladas por Russell y Burch en 1959, que es utilizado por el Comité de cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL) de la Universidad de Valparaíso.

También para evitar el estrés y el sufrimiento del animal aplicamos lo siguiente:

- ✓ Proveer de sustrato de papel y cilindros de cartón para su enriquecimiento durante su estadía en el bioterio
- ✓ Evitar el flujo reiterado de personal no esencial dentro de la sala del bioterio
- ✓ Mantener un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas
- ✓ Mantener un extractor de aire y una temperatura apta para su desarrollo a través de aire acondicionado
- ✓ Mantener comida y agua *ad libitum*

✓ Mantener bajos niveles de ruido en la sala

Los animales fueron sometidos a anestesia profunda (el animal que respira por sí sólo durante la sedación será monitoreado hasta la pérdida de conciencia, verificada por la ausencia de reflejos) con Isoflurano (CAS Number: 26675-46-7) (en la fase de inducción 2-2,5 % y durante la mantención 1-2%).

Una vez verificada la ausencia de reflejos, se procedió a la extracción del cerebro. El resto de tejido de los animales fueron mantenidos en refrigeración hasta su posterior retiro por una empresa externa especializada en el tratamiento de material biológico (Stericycle, www.sterycycle.cl).

Finalmente, recalcar, que todos los procedimientos experimentales fueron realizados siguiendo las directrices del protocolo bioético aprobado por el Comité Institucional de Bioética para la Investigación con Animales (CIBICA) de la Universidad de Valparaíso de Chile.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS

5.1 Estudios conductuales

Con el objetivo de poder determinar la función cognitiva de los ratones WT y APP/PS1, antes y después del tratamiento con PBN (Figura 8), realizamos en nuestros grupos animales una caracterización conductual utilizando tareas dependientes de estructuras cerebrales como el hipocampo y la neocorteza, afectadas tempranamente en la EA (94,95). Se realizaron tres pruebas conductuales para evaluar la actividad locomotora por medio del test OF, el nivel de exploración preferencial de objetos nuevos mediante el test de MRO y finalmente la memoria espacial de los ratones con el test Laberinto acuático de Morris.

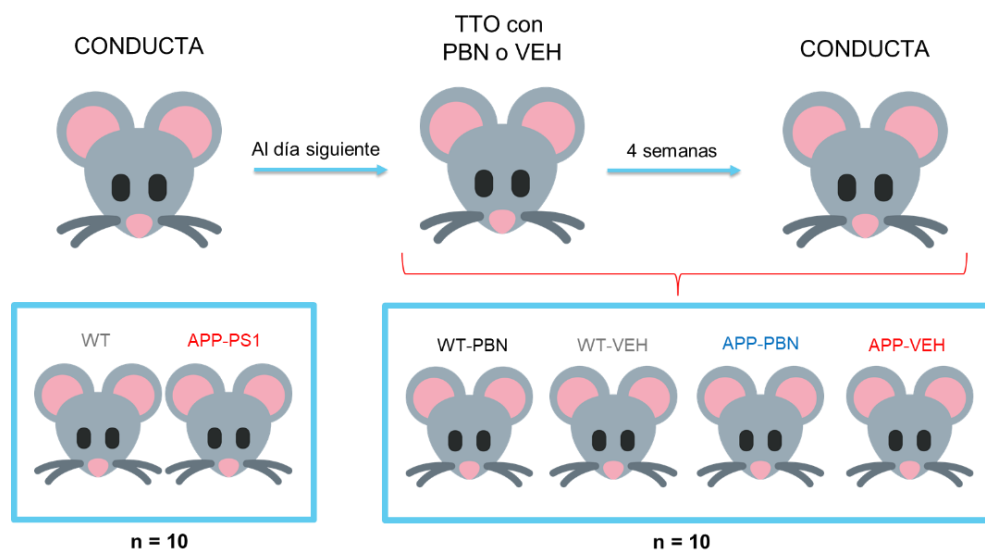


Figura 8. Diagrama representativo de grupos de animales sometidos a pruebas conductuales. Se observan grupos y N° de animales WT y APP / PS1, utilizados antes y después del TTO crónico con VEH o PBN.

6.1.1 Test Open Field

Durante un periodo de 3 días, los animales fueron sometidos a una prueba de exploración, con el fin de habituar a los animales tanto a las condiciones de experimentación, como a la caja (arena) utilizada para realizar sus trayectorias recorridas en la prueba conductual (Figura 9).

Observamos una leve reducción progresiva en la distancia recorrida por los animales APP/PS1 respecto a los WT antes del tratamiento crónico (Figura 10 A). Posterior al tratamiento, el ratón WT-VEH recorrió una distancia similar al pre-tratamiento a lo largo de las sesiones a diferencia del WT-PBN, que tuvo un aumento paulatino en su distancia recorrida, que al final de la prueba tendió a disminuir. Los APP/PS1-VEH tuvieron una menor distancia recorrida en comparación con los APP/PS1-PBN, los cuales presentaron un aumento considerable (Figura 10 B).

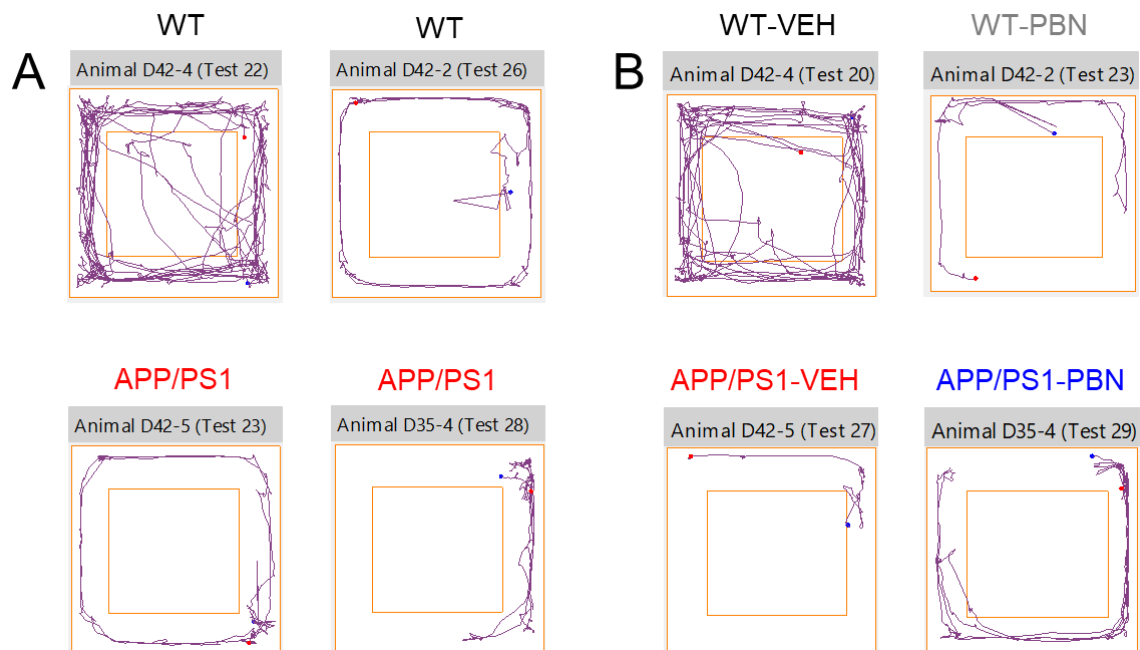


Figura 9. Diagrama representativo de las trayectorias de recorrido en la medición de actividad locomotora, para ratones WT y APP / PS1. A, Diagrama de trayectorias del recorrido de OF para cada grupo animal antes del TTO crónico con 100 mg / kg de VEH o

PBN (WT, negro) y (APP/PS1, rojo). **B**, Diagrama de trayectorias del recorrido de OF para cada grupo animal después del TTO crónico con 100 mg / kg de VEH o PBN (WT-VEH, negro), (APP/PS1-VEH, rojo), (WT-PBN, azul), (APP/PS1-PBN, gris).

Al evaluar la distancia recorrida al centro y a la periferia de la arena de entrenamiento, no se ven cambios significativos pre y post TTO con PBN, como también al momento de evaluar el N° de entradas que tuvo cada animal al centro y a la periferia antes y después del TTO (Figura 10).

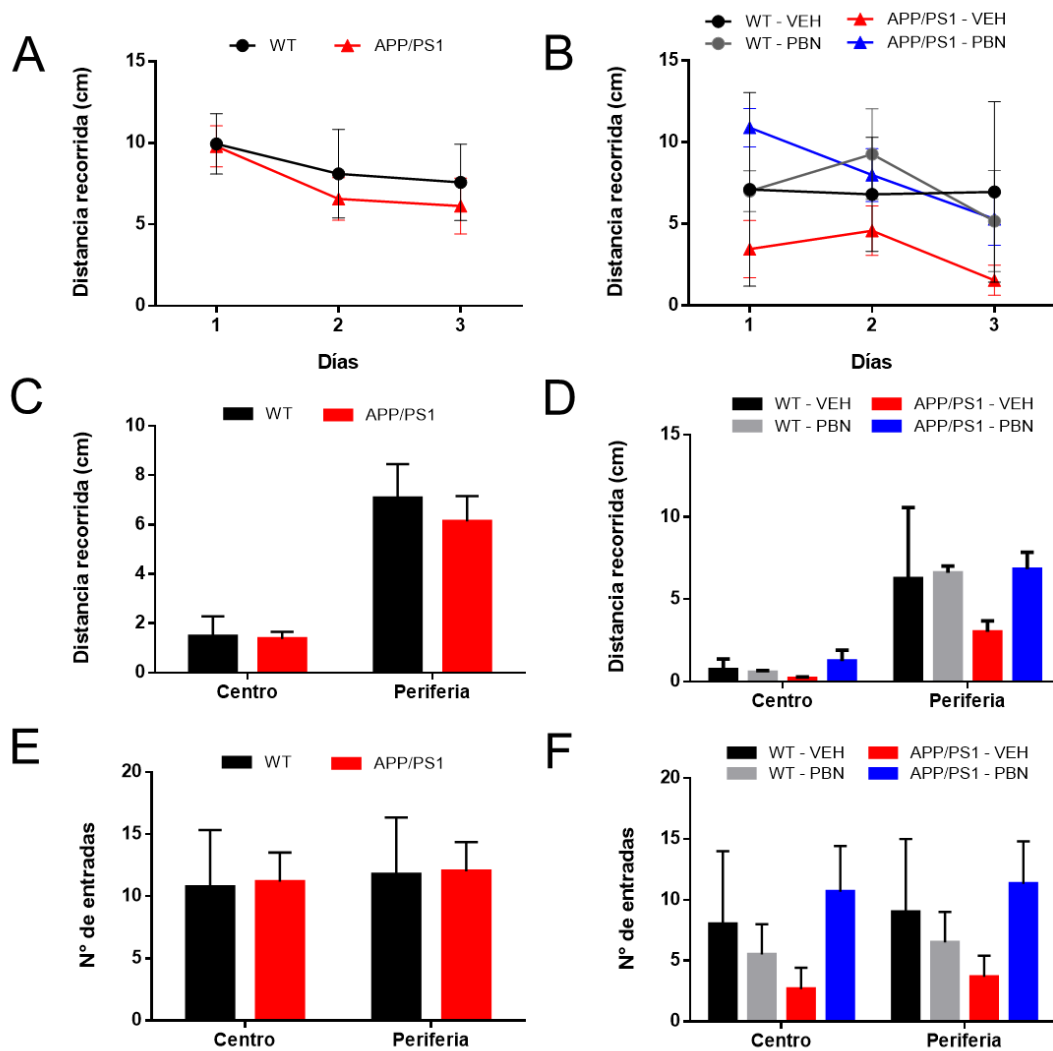


Figura 10. Efecto del bloqueo crónico de Panx-1 en la medición de actividad locomotora en campo abierto, para ratones WT y APP / PS1. **A y B**, Distancia recorrida por sesión antes (**A**) y después (**B**) TTO crónico con VEH o PBN. **C-D**, Distancia recorrida en el centro

y en la periferia de la arena de OF para cada grupo de estudio antes (C) y después (D) del TTO. E-F, N° total de entradas al centro y a la periferia de la arena de OF para cada grupo de estudio antes (E) y después (F) del TTO. Antes del TTO (WT, negro), (APP/PS1, rojo); después del TTO (WT-VEH, negro), (WT-PBN, gris), (APP/PS1-VEH, rojo), (APP/PS1-PBN, azul). Todos los datos se expresan como medias \pm SEM.

6.1.2 Test de Memoria de Reconocimiento de Objetos

A continuación, durante 2 días consecutivos los animales se sometieron al test de MRO, donde debían explorar objetos familiares y nuevos (Figura 11). Al evaluar el tiempo de exploración en los objetos familiares v/s nuevos, no vimos cambios significativos, a pesar de que se observó un aumento en la exploración de objetos nuevos en WT (pre-tratamiento) y WT-VEH (post-tratamiento), este no alcanzó a ser significativo. Al evaluar el índice de preferencia de los animales tanto para los objetos familiares como los nuevos, no notamos diferencias significativas, sin embargo, luego del TTO crónico observamos un aumento significativo entre el índice de preferencia de los objetos familiares y nuevos en WT-VEH (Figura 12D, T test, $* < p 0,05$) y en APP/PS1-PBN (Figura 12D, T test, $** < p 0,001$).

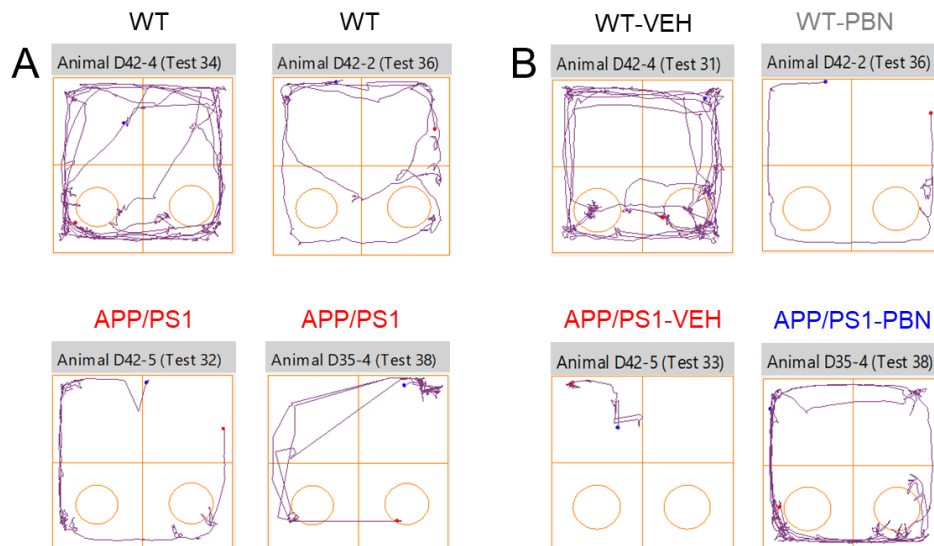


Figura 11. Diagrama representativo de la arena de entrenamiento donde se evaluó la memoria de reconocimiento de objetos, para ratones WT y APP / PS1. A, Diagrama de trayectorias del recorrido en MRO para cada grupo animal antes del TTO crónico con 100

mg / kg de VEH o PBN (WT, negro) y (APP/PS1, rojo). **B**, Diagrama de trayectorias del recorrido en el día 3 de evaluación de OF para cada grupo animal después del TTO crónico con 100 mg / kg de VEH o PBN (WT-VEH, negro), (APP/PS1-VEH, rojo), (WT-PBN, gris), (APP/PS1-PBN, azul).

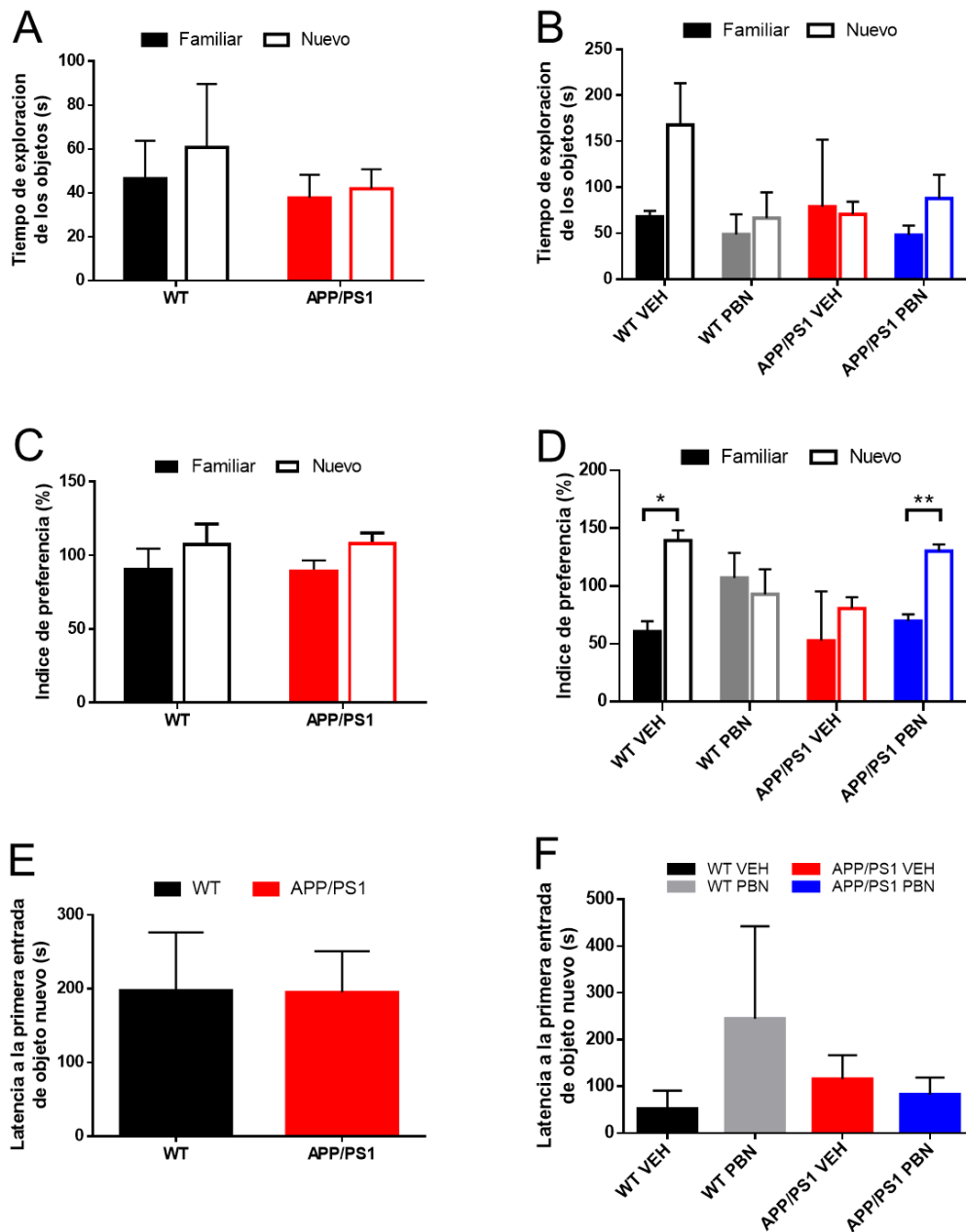


Figura 12. Efecto del bloqueo crónico de Panx-1 en el Test de Memoria de Reconocimiento de Objetos, en ratones WT y APP / PS1. A-B, tiempo de exploración de objetos familiares

*y nuevos para dos pares de objetos distintos evaluados en un TRO antes (A) y después (B) del TTO crónico con VEH o PBN. C-D, Índice de preferencia de exploración de objetos familiares y nuevos para los dos pares de objetos distintos evaluados en un TRO antes (C) y después (D) del TTO crónico con VEH o PBN. E-F Latencia a la primera entrada del objeto nuevo en TRO antes (E) y después (F) del TTO crónico con VEH o PBN. Todos los datos se expresan como medias \pm SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ (t-student).*

Al medir la latencia a la primera entrada del objeto nuevo, es decir, el tiempo en que se demora en llegar por primera vez a explorar el objeto, antes del TTO no vimos ninguna diferencia entre WT y APP/PS1, y pese a que después del TTO aumenta la latencia en WT-PBN no resultó un cambio significativo.

6.1.3 Test de Laberinto Acuático de Morris

Por último, los animales fueron evaluados para la memoria espacial en el Laberinto Acuático de Morris (MWM, Figura 13). Observamos que desde el pre-entrenamiento al día 4 de entrenamiento, la latencia de escape, es decir, el tiempo que se demoran en llegar a la plataforma oculta, disminuye, aunque no estadísticamente. En ambos grupos de animales, antes (Figura 14, A) y después del TTO vemos que cada grupo animal tiende a disminuir su latencia de escape, a excepción del APP/PS1-VEH que aumenta el último día, siendo en el pre-entrenamiento esta diferencia estadísticamente significativa para WT-PBN v/s APP/PS1-VEH, en el día 1 WT-PBN v/s APP/PS1-VEH; WT-PBN v/s APP/PS1-PBN y día 4 WT-PBN v/s APP/PS1-VEH, * $p < 0,05$ para cada uno (Figura 14, B).

Junto con esto, el día de la prueba sacamos la plataforma y medimos el tiempo que pasa el animal en la zona donde ésta estuvo oculta. Observamos que antes del TTO los tiempos son muy similares entre ambos grupos de animales, mientras que después del TTO, WT-VEH pasa más tiempo en la zona específica en comparación con los otros grupos

experimentales, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 14, C-D).

Al medir la distancia recorrida por los animales en todas sus sesiones, vemos que antes del TTO ambos grupos recorrieron una distancia similar. Después del TTO, a pesar de que no hubo cambios significativos, el animal APP/PS1-VEH tendió a recorrer una mayor distancia en comparación con los otros grupos experimentales (Figura 14, E-F).

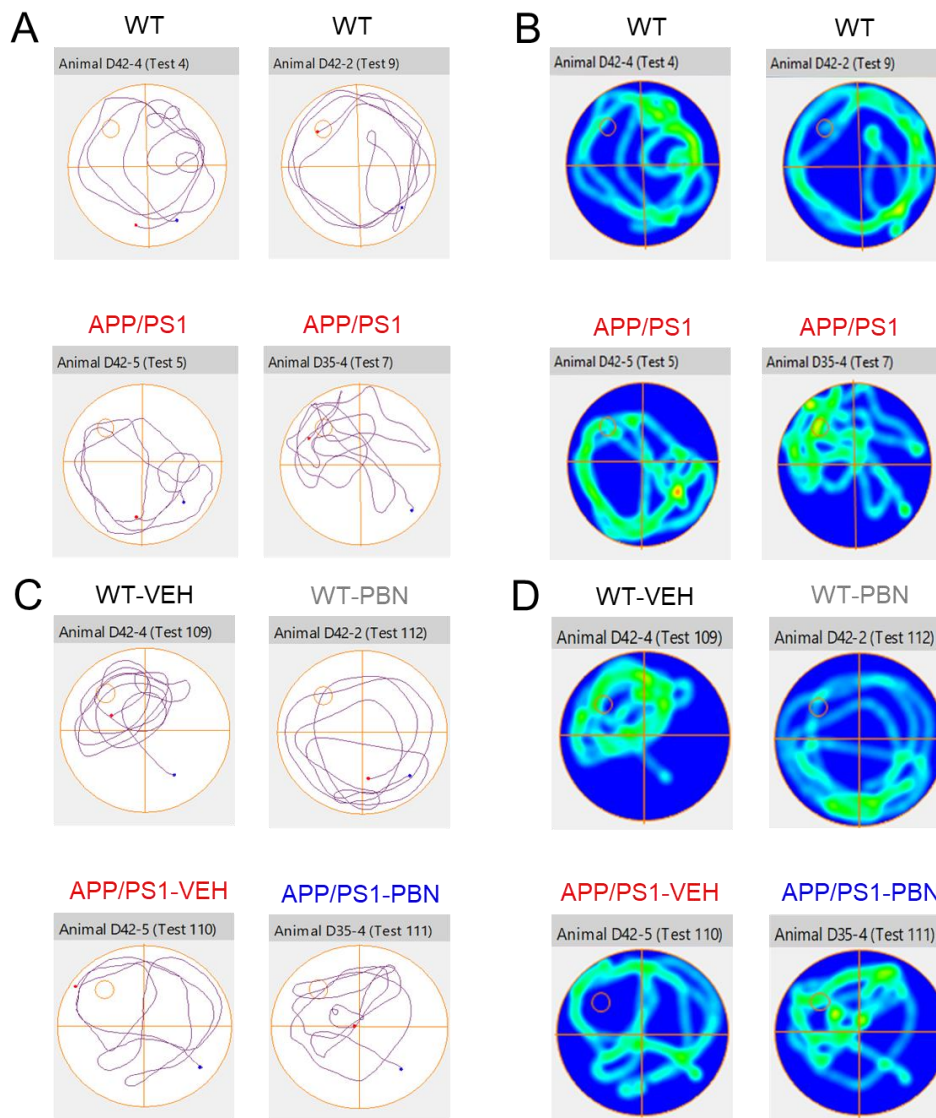


Figura 13. Diagrama representativo de la piscina de entrenamiento donde se evaluó la memoria espacial en la prueba del laberinto acuático de Morris, en ratones WT y APP /

PS1. A, Diagramas de trayectorias del recorrido en MWM, antes del TTO crónico con 100 mg / kg de VEH o PBN (WT, negro y APP/PS1, rojo). B, mapa de calor representativo de las trayectorias del recorrido en MWM, antes del TTO crónico. C, Diagramas de trayectorias del recorrido en MWM, después del TTO crónico con 100 mg / kg de VEH o PBN, (WT-VEH, negro; APP/PS1-VEH, rojo; WT-PBN, gris y APP/PS1-PBN, azul). D, mapa de calor representativo de las trayectorias del recorrido en MWM, después del TTO crónico.

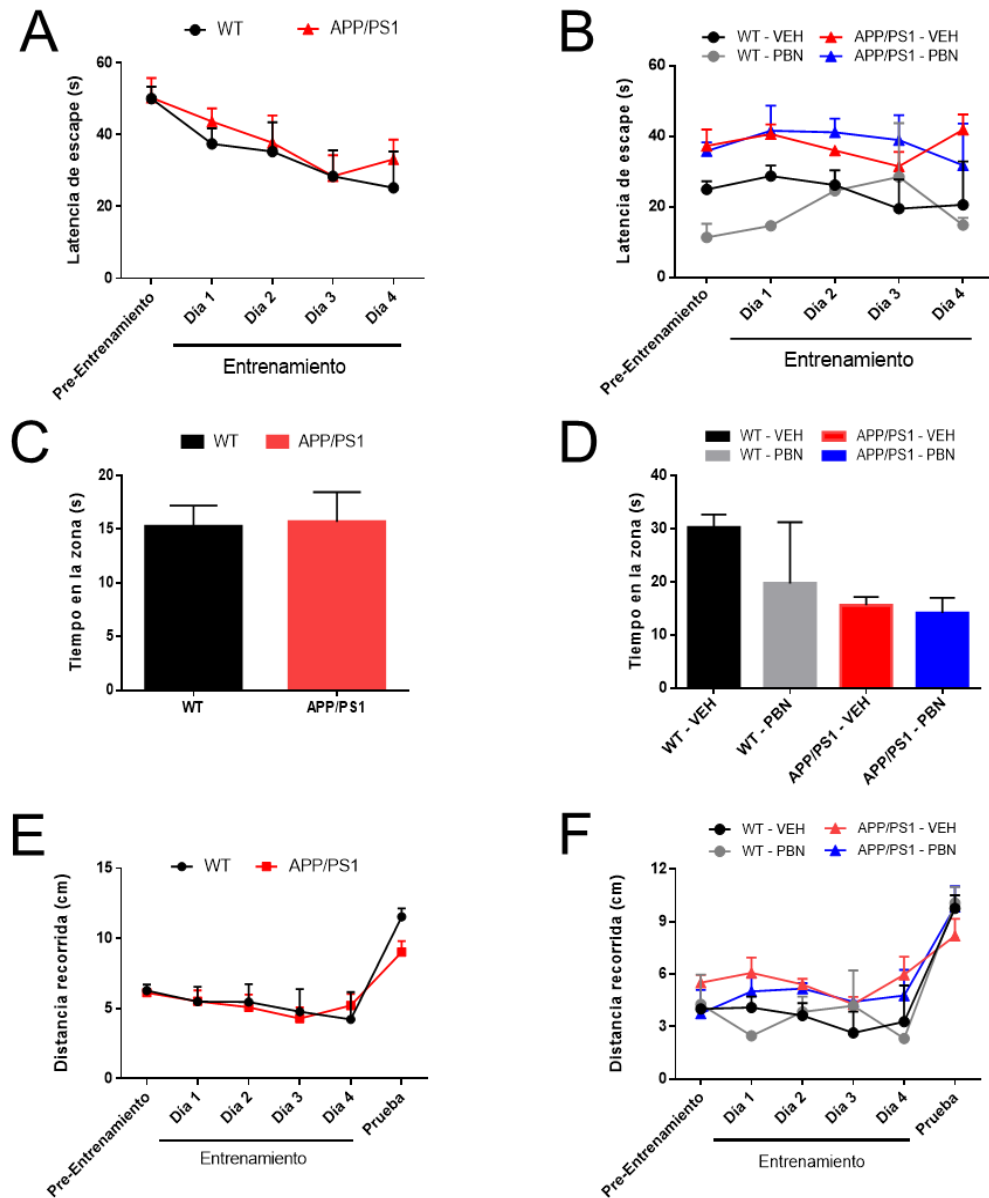


Figura 14. Efecto del bloqueo crónico de Pannexina-1 en la prueba del laberinto acuático de Morris, en ratones WT y APP / PS1. A, Latencia de escape evaluada en la prueba de

*laberinto acuático de Morris antes del TTO crónico con VEH o PBN (WT, negro y APP/PS1, rojo). B, Latencia de escape evaluada en la prueba de laberinto acuático de Morris después del TTO crónico con VEH o PBN (WT-VEH, negro; APP/PS1-VEH, rojo; WT-PBN, gris y APP/PS1-PBN, azul), pre-entrenamiento WT-PBN v/s APP/PS1-VEH *; Día 1 WT-VEH v/s APP/PS1-VEH *, WT-PBN v/s APP/PS1-PBN *; y Día 4 WT-PBN v/s APP/PS1-VEH * C, Tiempo que pasaron los animales, el día de la prueba, en el cuadrante objetivo donde se encontraba la plataforma oculta en el entrenamiento antes del TTO crónico. D, Tiempo que pasaron los animales, el día de la prueba, en el cuadrante objetivo donde se encontraba la plataforma oculta en el entrenamiento después del TTO crónico. E, Distancia recorrida en total desde el pre-entrenamiento, entrenamiento y prueba, antes del TTO crónico con VEH o PBN. F, Distancia recorrida en total desde el pre-entrenamiento, entrenamiento y prueba, después del TTO crónico con VEH o PBN. Todos los datos se expresan como medias \pm SEM, * $p < 0.05$ (ANOVA).*

5.2 Estudios histológicos

Finalizadas las pruebas conductuales, los animales fueron sacrificados para poder realizar el análisis histológico. El cerebro de los animales fue dividido para poder realizar distintos tipos de estudios (ver anexo 1).

5.2.1 Análisis histológico general

Con el fin de observar la morfología cerebral general, se realizó la tinción de rutina Hematoxilina-Eosina, donde no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales, en cuanto al tamaño y forma del cerebro, así como al grosor, celularidad y laminación de las cortezas cerebral e hipocampal (Figura 15).

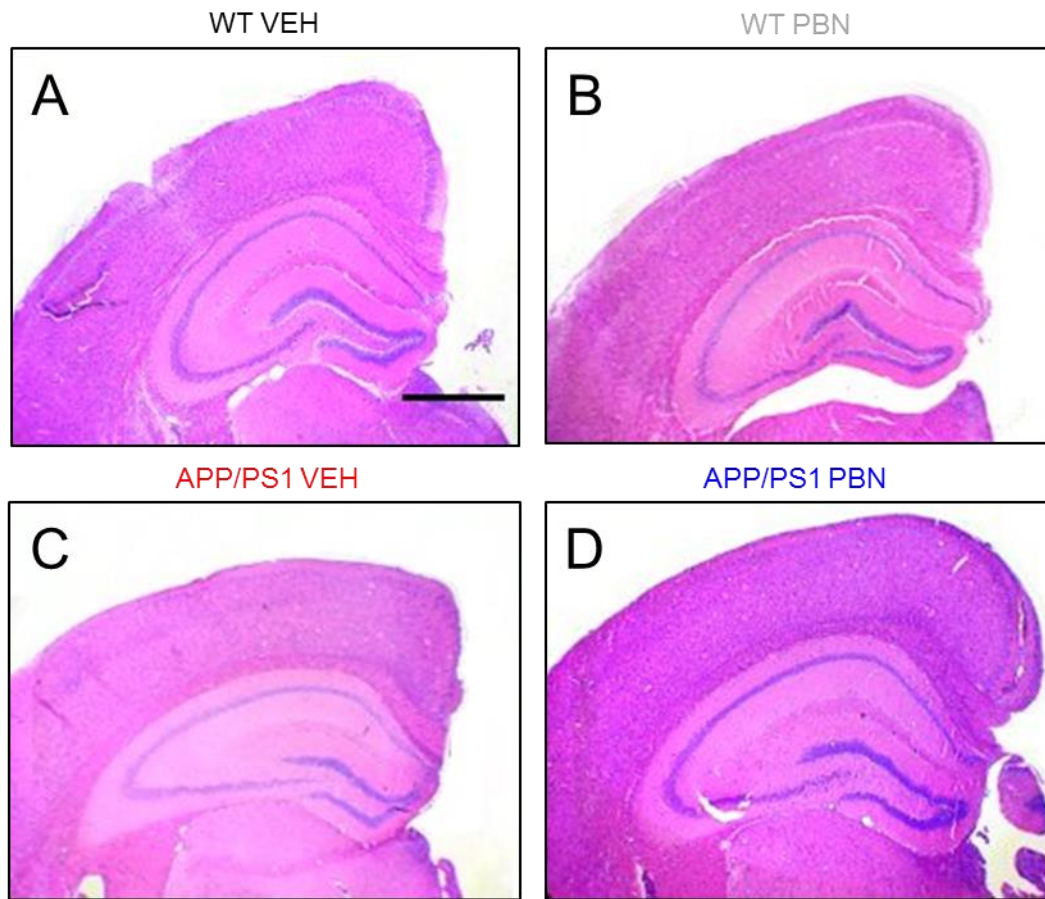


Figura 15. Morfología general de corteza e hipocampo en animales WT y APP/PS1 con y sin tratamiento con PBN. Microfotografías representativas de la tinción de rutina Hematoxilina-Eosina de hipocampo y parte de la corteza cerebral de los ratones WT VEH (A), WTPBN (B), APP/PS1 VEH (C) y APP PBN (D). La barra de escala representa 1000 μ m.

5.2.2 Detección de la proteína Panexina1 por Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Posteriormente, estudiamos la expresión de la proteína Panx1 mediante inmunohistoquímica. Observamos que Panx1 se distribuye por toda la corteza cerebral e

hipocampo (Figura 16). Panx1 se localiza abundantemente en la membrana neuronal, en astrocitos y en vasos sanguíneos, con un patrón punteado y en menor medida en el neuropilo con un patrón difuso y homogéneo. Por otro lado, en los ventrículos laterales observamos que la proteína se encuentra en el citoplasma de células ependimarias y plexos coroideos (Figura 17).

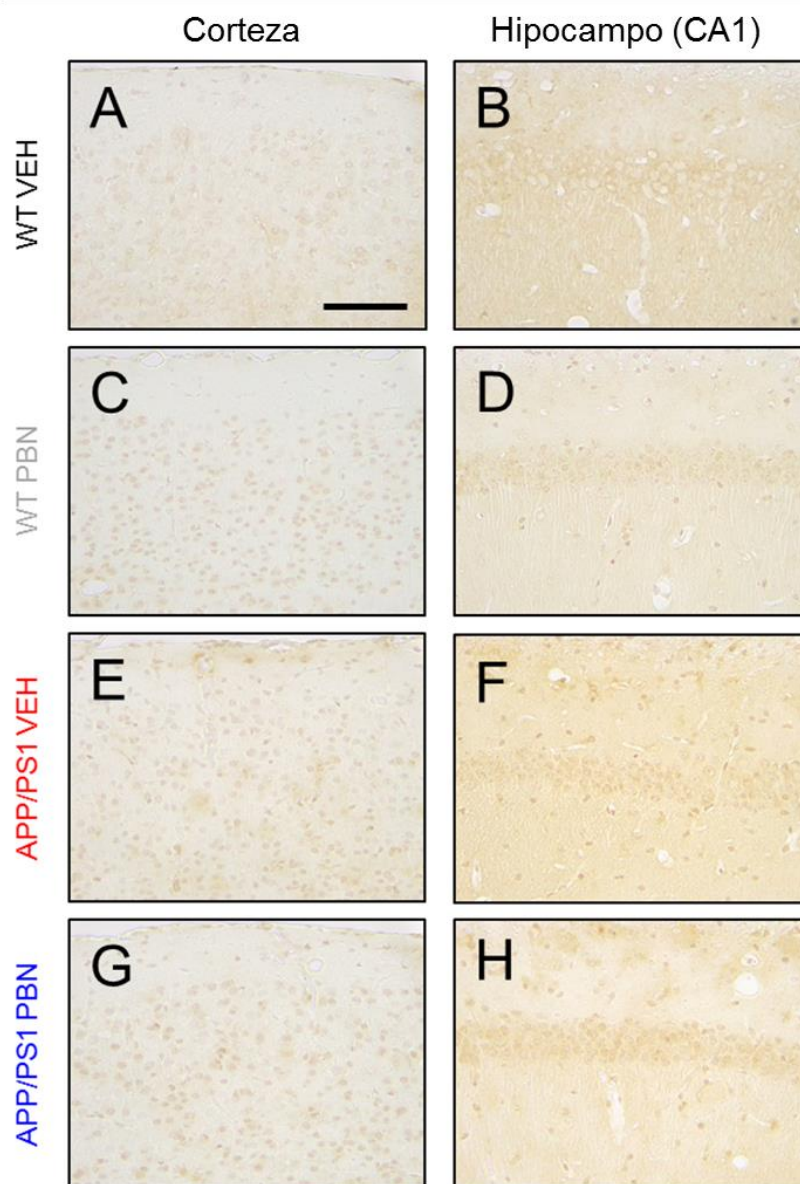


Figura 16. *Expresión de Panexina-1 en corteza cerebral e hipocampo en ratones WT y APP/PS1 con y sin tratamiento con PBN. A-H, Microfotografías representativas de la detección inmunohistoquímica de Panx1 (marrón) en corteza cerebral (A, C, E y G) e*

hipocampo (B, D, F y H) en ratones WT VEH (A y B), WT PBN (C y D), APP/PS1 VEH (E y F) y APP/PS1 PBN (G y H). La barra de escala representa 22 μ m.

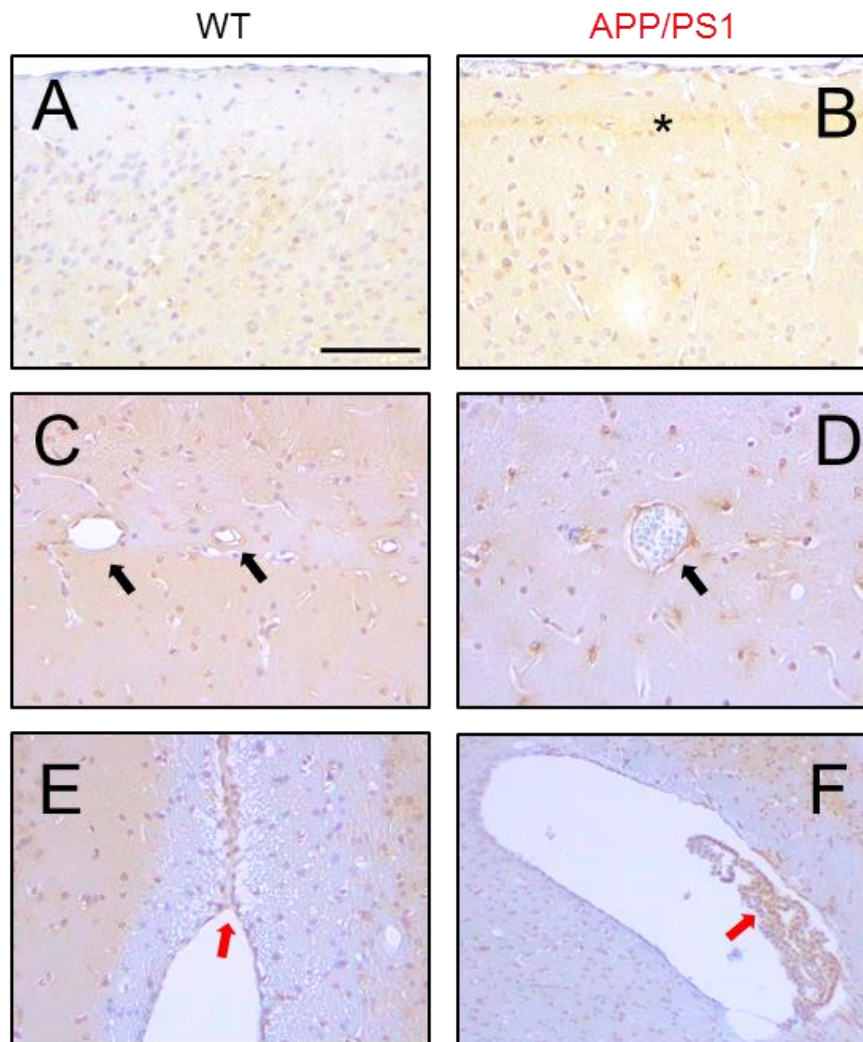


Figura 17. Localización regional y celular de Panx1 en el cerebro del ratón WT y APP/PS1. Se muestra la localización de Panx1 corteza cerebral (A y B), en vasos sanguíneos (flechas negras; A y D) y en los ventrículos laterales (E y F), en ratones WT (A, C y E) y en ratones APP/PS1 (B, D y F). Note la mayor intensidad de inmunotinción de Panx1 (marrón) a partir de la capa granular externa de la corteza cerebral de los ratones WT y APP/PS1. Note la gran intensidad de inmunotinción en neuropilo a nivel de la capa granular externa de corteza en el ratón APP/PS1. En E y F note la expresión de Panx1 en células endoteliales y plexos coroideos (flechas rojas), respectivamente. La barra de escala representa 100 μ m.

No encontramos diferencias en el inmunomarcaje de Panx1 entre animales con y sin tratamiento con PBN. Sin embargo, observamos una leve diferencia en la intensidad del inmunomarcaje al comparar entre cepas, pues los ratones APP/PS1 presentaron una mayor intensidad de inmunomarcaje en comparación con los ratones WT (Figura 16).

Tanto en ratones WT como APP/PS1, la corteza cerebral presenta una mayor intensidad de inmunomarcaje a partir de la capa 2, aumentando a hacia las capas más profundas, hasta llegar al límite con el cuerpo calloso.

Por otro lado, los ratones APP/PS1 presentaron una mayor cantidad de astrocitos inmunopositivos para Panx1, los que además presentaron una morfología reactiva, es decir, tenían un mayor N° de prolongaciones otorgándoles una forma estrellada. En cambio, los ratones WT poseían astrocitos con una morfología normal. Además, en el ratón APP/PS1 varios de estos astrocitos se encontraban bordeando placas amiloides, cuyos bordes presentaban una gran intensidad de inmunomarcaje para Panx1 (Figura 18).

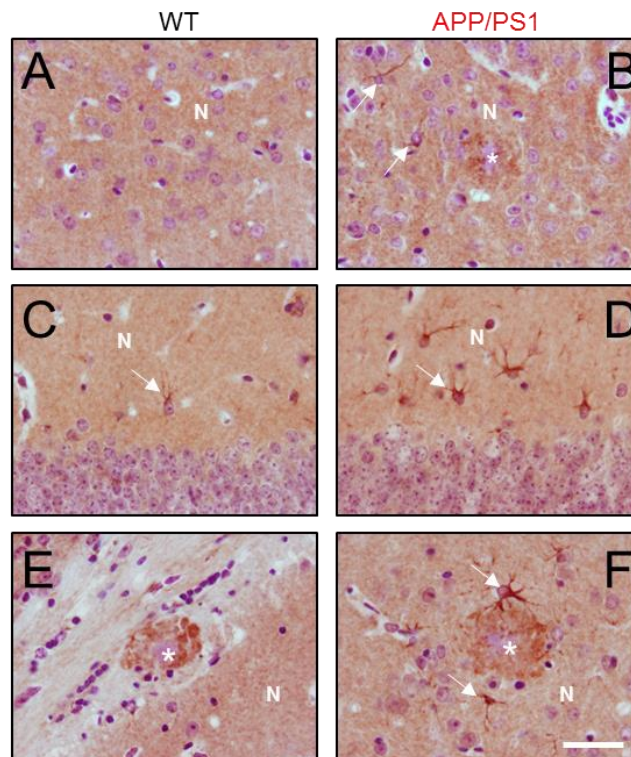


Figura 18. *Expresión de Panexina-1 en corteza cerebral e hipocampo del ratón WT y APP/PS1. A-F, Microfotografías representativas del inmunomarcaje de Panx1 (marrón) en corteza cerebral (A, B, F), hipocampo (C, D) y cuerpo calloso (E) en ratones WT (A, C y E)*

y *APP/PS1* (**B**, **D** y **F**). Los cortes histológicos fueron contrastados con Cresil Violeta (azul violáceo). Nótese la inmunoreactividad para *Panx1* en el neuropilo (**N**), bordeando placas amiloides (asteriscos) y astrocitos con morfología reactiva (flechas en **B**, **C**, **D** y **F**). La barra de escala representa 22 μ m.

Para confirmar que *Panx1* se localizaba rodeando placas amiloides, realizamos la técnica histoquímica Rojo Congo y la inmunodetección del péptido AB mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. Las placas de amiloide resultaron ser positivas para las técnicas antes mencionadas, las que además sólo se observaron en el ratón *APP/PS1*, corroborando que estos ratones efectivamente son un modelo de la EA (Figura 19)

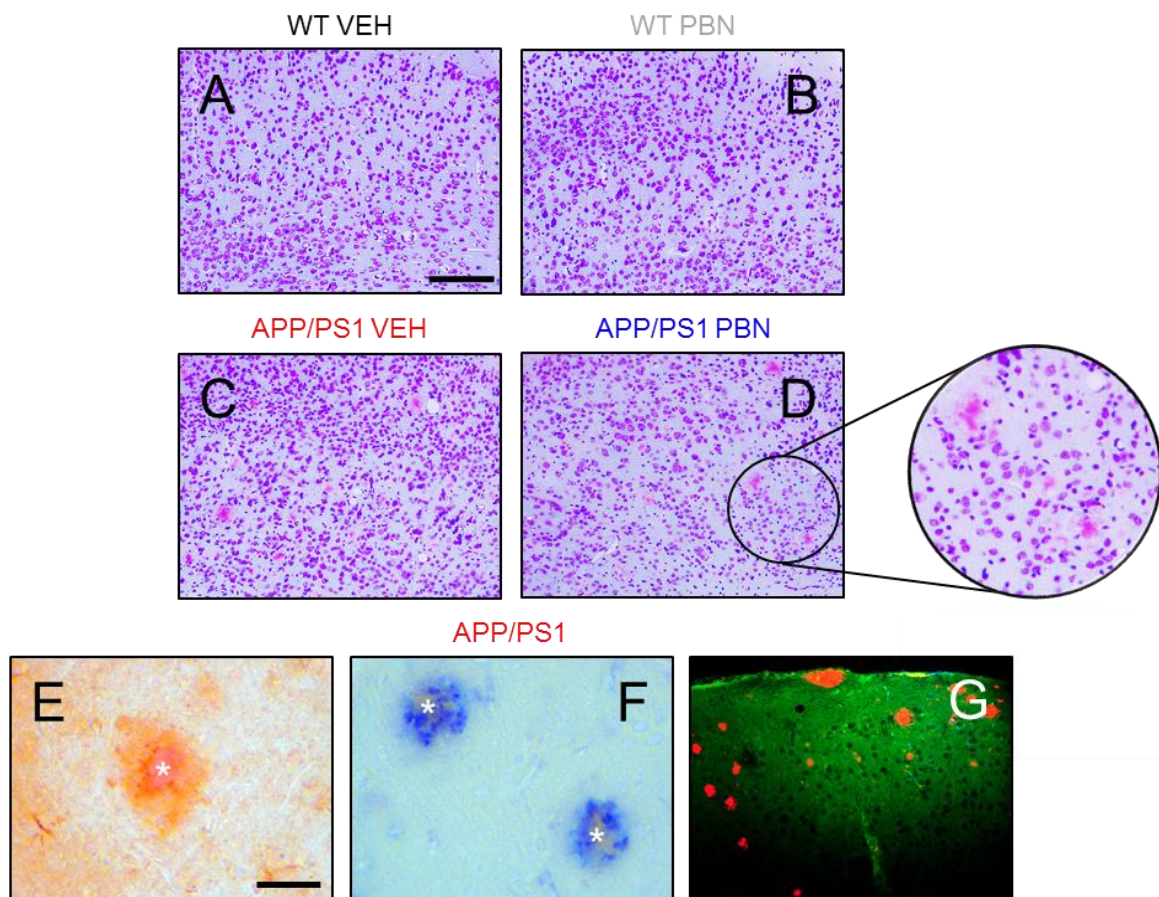


Figura 19. *Expresión de Panx1 alrededor de placas amiloides. A-D*, Microfotografías representativas de la tinción Rojo Congo contrastado con Cresil Violeta en corteza cerebral

de los ratones *WT VEH* (**A**), *WT PBN* (**B**), *APP/PS1 VEH* (**C**) y *APP PBN* (**D**). Note la gran cantidad de placas amiloides presentes sólo en los ratones *APP/PS1* (**B**, y **D**). **E**, Inmunotinción para *Panx1* (marrón) contrastado con Rojo Congo (placas amiloides en rojo) en la corteza cerebral. **F**, Inmunotinción doble para *Panx1* (azul) y 6E10 (placas amiloides; marrón) en la corteza cerebral. **G**, Inmunofluorescencia para 6E10 (placas amiloides; rojo) y *Panx1* (verde) en la corteza cerebral. Note la presencia de *Panx1* alrededor de las placas amiloides (asteriscos) La barra de escala (**A-D**) representa 200 μ m y (**E-F**) 22 μ m.

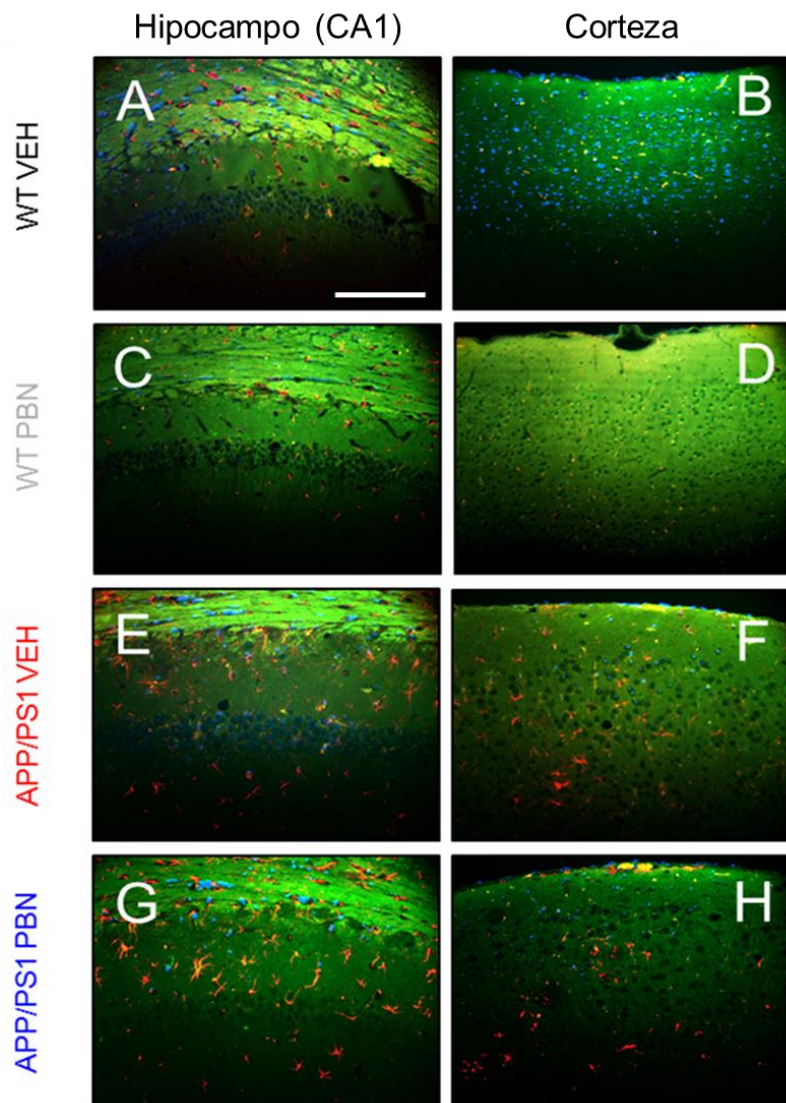


Figura 20. Astrocitos en corteza cerebral y CA1 de hipocampo marcados con técnicas de inmunofluorescencia. **A-H**, Microfotografías representativas de la detección por

inmunofluorescencia de Panx1 (verde) y astrocitos con GFAP (rojo) en corteza cerebral (B, D, F y H) e hipocampo (A, C, E y G). Los cortes histológicos fueron contrastados con DAPI (azul). Nótese la co-localización de GFAP y Panx1 (Amarillo) en los astrocitos. La barra de escala representa 50µm.

Para corroborar que Panx1 se expresaba en astrocitos, realizamos una inmunofluorescencia doble, con los anticuerpo anti-Panx1 y anti-GFAP, éste último un marcador de astrocitos (Figura 20). Observamos que ambas proteínas se coexpresaban en los astrocitos. Ambos ratones APP/PS1, tratados con PBN y con el VEH, presentaron un mayor N° de astrocitos y con una mayor cantidad de prolongaciones en comparación a los ratones WT. Aunque ambos ratones APP/PS1 presentaron astrogliosis y una morfología reactiva de los astrocitos, el ratón tratado con PBN presentó estos signos en mayor magnitud que el tratado con VEH.

5.2.3 Estudio de neurodegeneración

Para observar los efectos del tratamiento sobre la neurodegeneración, utilizamos la técnica de Cresil Violeta. En la región de CA1 del hipocampo, se seleccionaron campos de 100 x 200 µm, en lo que se cuantificaron todos los somas de neuronas viables e inviables (signo de neurodegeneración). Los criterios que permitieron discernir qué células presentaban neurodegeneración correspondieron a: hiper cromatismo citoplasmático, encogimiento celular (picnosis) y fragmentación nuclear (91,96). No se observaron diferencias significativas entre animales tratados con PBN y con el VEH, pero si entre cepas de animales, donde los ratones APP/PS1 presentaron una mayor cantidad de somas inviables en comparación a los WT (Figura 21).

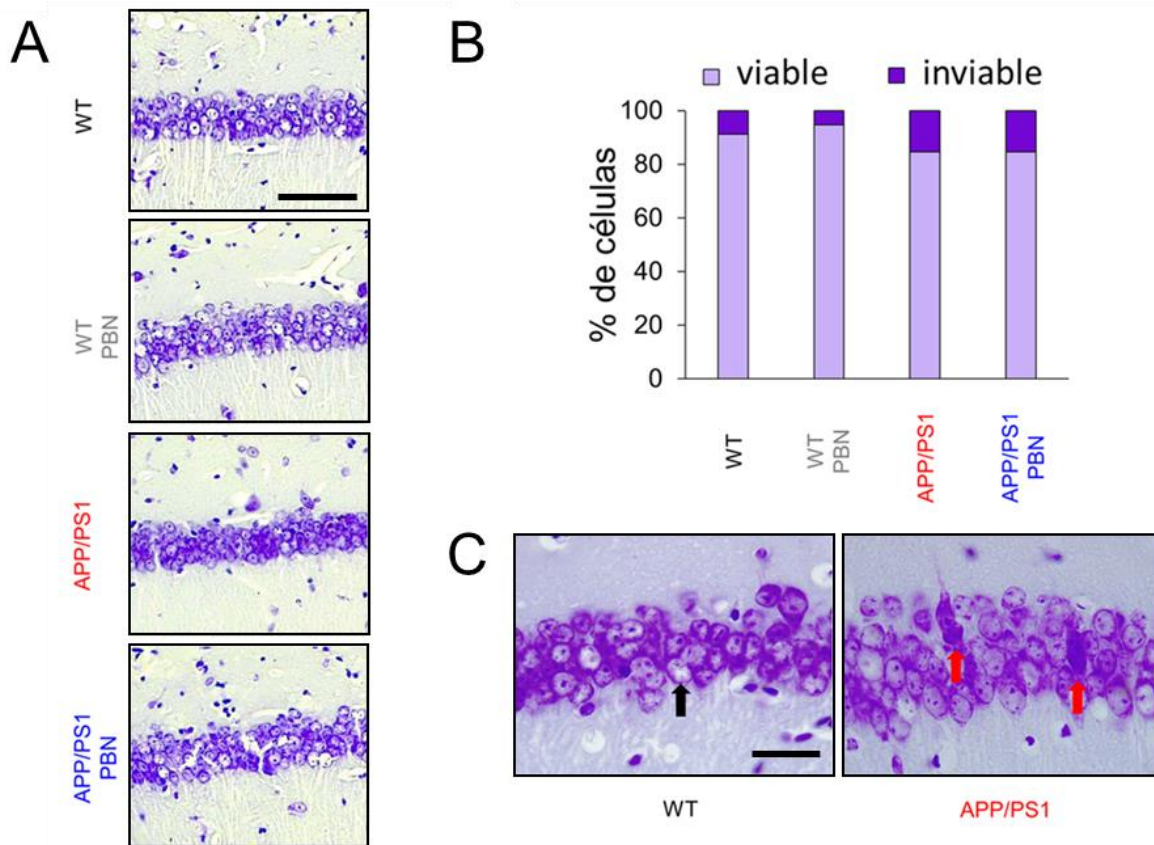


Figura 21. Efecto del tratamiento crónico con PBN sobre la viabilidad celular en ratones WT y APP/PS1. *A*, Microfotografías representativas de la capa piramidal en CA1 del hipocampo utilizando la tinción de Cresil Violeta, en animales WT y APP/PS1 con y sin tratamiento (20x). *B*, Análisis cuantitativo de células viables (lila) e inviables (morado) en animales WT con PBN y VEH y animales APP/PS1 con PBN y VEH. *C*, Microfotografías representativas de somas neuronales de la capa piramidal de CA1 teñidas con Cresil Violeta (100x). Se pueden observar células bien conservadas o viables (flecha negra) y células picnóticas o inviables (flecha roja). La barra de escala en *A* representa 50 μ m y en *C* 22 μ m.

5.2.4 Estudio de morfología dendrítica

Para comparar la morfología y densidad dendrítica de neuronas hipocampales del cerebro de ratones WT y APP/PS1 con y sin TTO con PBN, realizamos la tinción de Golgi-Cox (Figura 22).

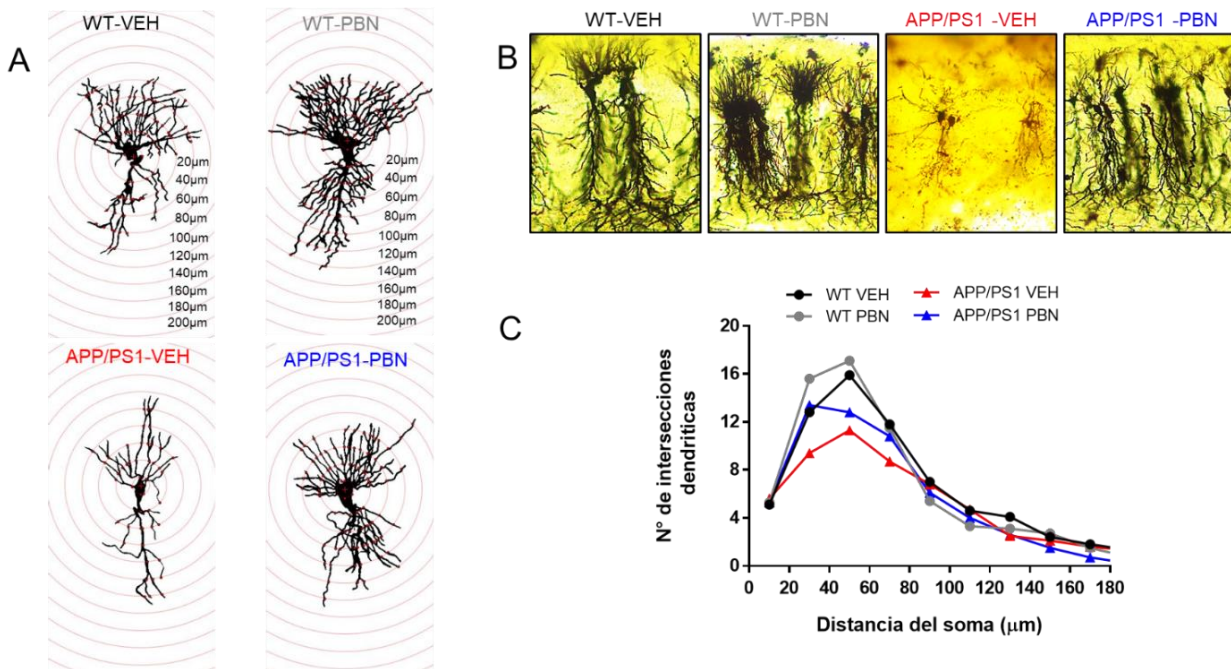


Figura 22. Análisis de la morfología dendrítica de neuronas piramidales de CA1. **A**, análisis de Sholl para neuronas de animales WT-VEH, WT-PBN, APP/PS1-VEH y APP/PS1-PBN. Los círculos concéntricos están espaciados cada 20 micras de distancia del soma. **B**, Microfotografías 20x de neuronas hipocampales teñidas con la técnica de Golgi-Cox para cada grupo de estudio. **C**, N° de intersecciones dendríticas respecto de la distancia de hasta 180 micras desde el soma. Note la escasa cantidad de prolongaciones en la neurona representativa del ratón APP/PS1 VEH. Todos los datos se expresan como medias \pm SEM.

Para el estudio de la morfología de las dendritas, realizamos dibujos de las neuronas teñidas con la tinción de Golgi-Cox, mediante la observación en un microscopio acoplado a una cámara lúcida. Cuantificamos las ramificaciones dendríticas utilizando el análisis de

Sholl. Para ello trazamos círculos concéntricos cuyos radios incrementaron cada 20 μm de distancia desde el soma de la neurona (Figura 22, A) Observamos a través de microfotografías, que el bloqueo de Panx1 con PBN modifica la morfología dendrítica en el hipocampo de ratones APP/PS1 (Figura 22, B). A su vez, entre 40-70 μm de distancia del soma, se observó un aumento en el N° de intersecciones en ambos grupos animales que se trataron con PBN en comparación a los tratados con VEH (Figura 22, C).

Al analizar la arborización dendrítica, clasificamos a las dendritas en basales o apicales (Figura 23, A-B), y es así como observamos una mayor cantidad de ramificaciones dendríticas basales en ambos grupos de ratones tratados con PBN respecto a los tratados con el VEH. Encontramos cambios significativos en WT-PBN v/s APP/PS1-VEH $**p<0.01$, y en WT-PBN v/s APP/PS1-PBN $*p<0.05$ (Figura 23, C). En dendritas apicales, hay un mayor N° de ramificaciones, estadísticamente significativo, en WT-VEH v/s APP/PS1-VEH $***p<0.001$ y WT-PBN v/s APP/PS1-VEH $**p<0.01$ (Figura 23, D). Al analizar el N° de ramificaciones totales (basales y apicales), vimos un mayor N° en ambos grupos tratados con PBN respecto a los tratados con el VEH, con diferencias significativas en WT-VEH y WT-PBN v/s APP/PS1-VEH $***p<0.001$ (Figura 23, E).

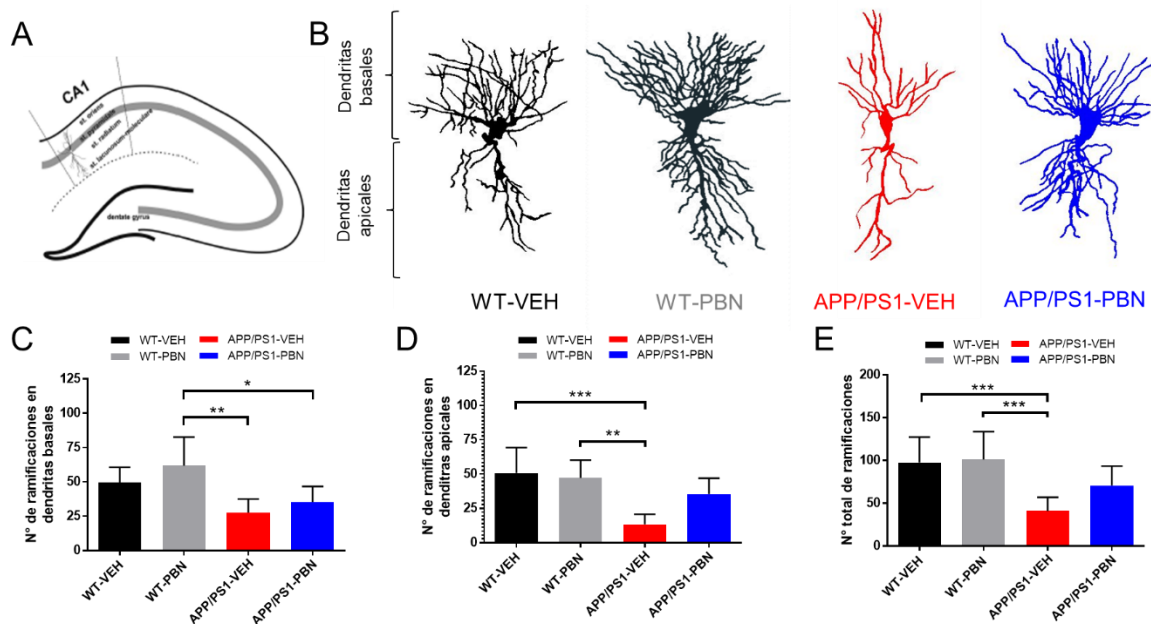


Figura 23. El TTO crónico con PBN modificó la morfología dendrítica en ratones APP/PS1. A, Representación esquemática del hipocampo. En el área de CA1, las neuronas

*piramidales presentan dendritas basales (las que se proyectan hacia el cuerpo calloso) y apicales (las que se proyectan hacia la circunvolución dentada). B, Dibujos representativos de neuronas ubicadas en la capa piramidal de CA1 del hipocampo, teñidas con la técnica de Golgi-Cox, de ratones WT-VEH (negro), WT-PBN (gris), APP/PS1-VEH (rojo) y APP/PS1-PBN (azul). Note la mayor densidad dendríticas en los ratones tratados con PBN. C-D, N° de ramificaciones dendríticas según su localización, basales (C) y apicales (D). E, Comparación del promedio del N° de ramificaciones dendríticas por neuronas de cada grupo animal. Todos los datos se expresan como medias \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (ANOVA).*

Encontramos cambios significativos en la arborización dendrítica entre los grupos (Figura 24). El bloqueo de Panx1 con PBN aumentó el N° de ramas clasificadas de acuerdo con el orden de ramificación (Figura 24, A). Observamos que en la frecuencia total (basales y apicales) de dendritas (Figura 24, B), en el orden 1 hay significancia estadística para WT-PBN v/s APP/PS1-VEH *; en orden 2 WT-VEH v/s APP/PS1-VEH *; WT-PBN v/s APP/PS1-VEH **; orden 3 WT-PBN v/s APP/PS1-VEH *, mientras que al analizar la frecuencia de dendritas basales que hay en cada orden (Figura 24, C), vemos significancia sólo en el orden 2 WT-VEH v/s WT-PBN *; WT-PBN v/s APP/PS1-VEH ** ; WT-PBN v/s APP/PS1-PBN *, y finalmente al analizar la frecuencia dendrítica apical (Figura 24, D), vimos datos significativos en el orden 1 WT-VEH v/s APP/PS1-VEH *, orden 2 WT-VEH v/s APP/PS1-VEH **, orden 3 WT-VEH v/s APP/PS1-VEH* y orden 4 WT-PBN v/s APP/PS1-VEH *, donde * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (ANOVA).

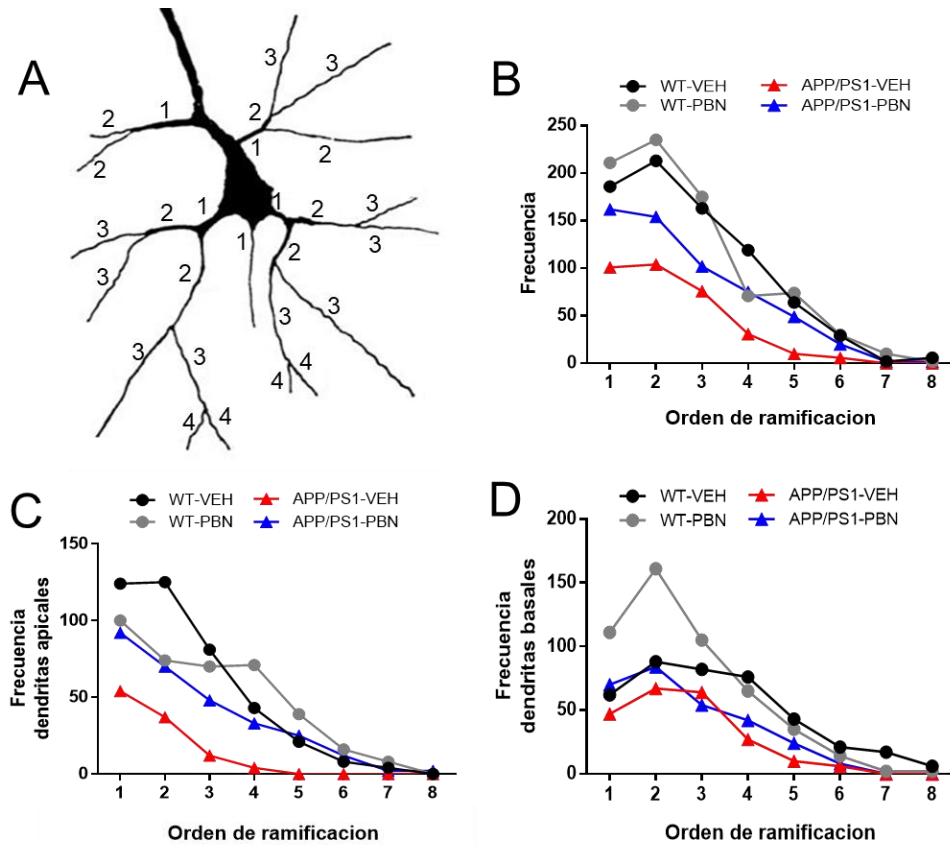


Figura 24. Clasificación de orden dendrítico para neuronas de CA1. *A*, Representación esquemática de una neurona piramidal clasificada según orden de ramificación. *B*, frecuencia de dendritas con ramificaciones de determinado orden (orden 1 WT-PBN v/s APP/PS1-VEH *; en orden 2 WT-VEH v/s APP/PS1-VEH *; WT-PBN v/s APP/PS1-VEH **; orden 3 WT-PBN v/s APP/PS1-VEH *). *C*, frecuencia de dendritas apicales con ramificaciones de determinado orden (orden 2 WT-VEH v/s WT-PBN *; WT-PBN v/s APP/PS1-VEH ** ; WT-PBN v/s APP/PS1-PBN *). *D*, frecuencia de dendritas basales con ramificaciones de determinado orden (orden 1 WT-VEH v/s APP/PS1-VEH *, orden 2 WT-VEH v/s APP/PS1-VEH **, orden 3 WT-VEH v/s APP/PS1-VEH* y orden 4 WT-PBN v/s APP/PS1-VEH *). Todos los datos se expresan como medias \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (ANOVA).

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN

La EA es una afección neurodegenerativa progresiva relacionada con la edad, que se manifiesta con un deterioro grave de las funciones cognitivas (4). Los os β A se han señalado como responsables de la sinaptopatía temprana que ocurre en la patología, causando defectos en la morfología neuronal (66,97), alteraciones en el tráfico de receptores (65,98,99) y consecuentemente alterando la transmisión excitatoria y plasticidad sináptica (59).

En este estudio sugerimos que Panx1, un canal transmembrana no selectivo que conecta los espacios intracelulares y extracelulares (100), podría jugar un rol importante en el déficit sináptico inducido por los osA β observado en un modelo de ratón de EA. Para este fin, utilizamos el medicamento PBN, el cual es capaz de bloquear la actividad de los canales de Panx1 (90). Se ha demostrado que PBN protege contra la excitotoxicidad inducida por os β A (91) y condiciones inflamatorias en SNC (101–103). Curiosamente, estudios recientes informaron que los pacientes con gota tratados con diferentes uricosúricos, incluido PBN, tienen un menor riesgo de desarrollar demencia no vascular (104) y EA (105).

Es por ello, que lo consideramos como un posible agente terapéutico para combatir la EA, probando su uso continuo vía oral a modo de que su administración sea lo menos invasiva posible.

En este estudio se utilizó una dosis de 100 mg/kg. que corresponde a 2,5 veces la dosis de mantención que se administra a personas para bloquear la excreción renal de penicilina, la cual no representa riesgos tóxicos o teratogénicos en ratones (106). Para lograr que los ratones voluntariamente fueran administrados con PBN, utilizamos un gel con sucralosa, medio que ha sido utilizado anteriormente en un estudio para la administración vía oral de un fármaco en ratones (107).

6.1 Memoria y capacidad cognitiva

Para determinar la función cognitiva de los ratones WT y APP/PS1, antes y después del tratamiento con PBN, realizamos una primera aproximación en nuestra búsqueda de correlatos entre neurodegeneración tipo EA y alteraciones cognitivas, ya que, un componente cognitivo afectado tempranamente en la EA es la agnosia o pérdida de la capacidad de reconocimiento de personas y objetos (108). Es por ello que efectuamos una caracterización conductual evaluando la capacidad cognitiva en el modelo de EA, utilizando tareas dependientes de estructuras cerebrales como el hipocampo y la neocorteza, afectadas tempranamente en la EA (94,95).

De acuerdo con lo observado luego de la evaluación conductual, el tratamiento con PBN no generó cambios significativos en los grupos experimentales tanto en actividad locomotora como memoria espacial. No obstante, nuestros resultados son similares a lo expuestos por Lalonde y cols. (109) en el año 2003, donde usando animales de la misma cepa, observan una menor actividad locomotora, de reconocimientos de objetos y de memoria espacial. En un estudio realizado por Paul Carrillo-Mora y cols. (91) en el año 2010, investigando el efecto de la administración sistémica de L-kynurenine y PBN en el hipocampo de rata, sobre las alteraciones conductuales y morfológicas inducidas por A β , los investigadores encontraron resultados similares a los descritos en esta tesis respecto a la distancia recorrida en test de OF, donde se ve que el ratón APP/PS1-PBN tiene una mayor distancia recorrida respecto al WT-VEH. Además, la distancia recorrida al centro y a la periferia en el OF, así como una menor latencia de escape en el MWM, coinciden con nuestros resultados (WT-PBN, luego WT-VEH, APP/PS1-PBN y finalmente APP/PS1-VEH).

En la prueba de reconocimiento de objetos, si hubo cambios significativos en el índice de preferencia, donde los animales WT-VEH y APP-PS1 PBN exploraron por un mayor tiempo el objeto nuevo en comparación al familiar, tiempo que fue similar en ambos ratones. También se evaluó el tiempo de exploración para cada grupo animal, donde vimos resultados similares a lo publicado por Prochnow en el año 2012 (84), ya que aplicó esta misma prueba

conductual en animales KO de Panx, donde curiosamente este ratón tuvo un performance muy similar al ratón WT-PBN de nuestro estudio, lo que corrobora el uso efectivo del PBN como bloqueador de los canales de Panx1.

6.2 Caracterización de la expresión de Panx1

La información que existe sobre la localización de Panx1 en el cerebro murino es escasa. Se ha descrito que Panx1 se expresa abundantemente en astrocitos y en neuronas de diferentes estructuras cerebrales, incluida la corteza cerebral e hipocampo (110–113). A nivel subcelular se ha descrito su ubicación en la densidad postsináptica (114) y también se ha observado un aumento en su expresión en aquellos astrocitos que se encuentran circundantes a placas amiloides (115). De otras estructuras cerebrales no existe información al respecto, como tampoco sobre su expresión en pacientes o modelos animales de la EA, es por ello por lo que nos propusimos analizar la expresión de Panx1 a nivel regional, celular y subcelular en ratones APP/PS1 y controles de 18 meses, los cuales son considerados adultos mayores.

Para poder observar la expresión de Panx1 en el cerebro murino, realizamos técnicas inmunohistoquímicas. A partir de los resultados obtenidos, podemos concluir que existe un aumento de la expresión de Panx1 en vasos sanguíneos, citoplasma de células endoteliales del ventrículo lateral y membrana de neuronas corticales a partir de la capa granular externa que se intensifica a mayor profundidad en ambas cepas, no observándose cambios respecto al tipo de tratamiento. La expresión de Panx1 en vasos sanguíneos podría deberse a la presencia de astrocitos adyacentes, los cuales cumplen un papel importante en la regulación del flujo sanguíneo, como el aumento o disminución del diámetro de los vasos sanguíneos mediante la liberación de mediadores moleculares específicos (116,117) o el cambio de flujo local del SNC en respuesta a cambios en la actividad neuronal (118). Recientemente, en un estudio realizado en nuestro laboratorio, se utilizó la técnica de InmunoGold para la detección de Panx1, observando su expresión a nivel mitocondrial. De

acuerdo con la literatura, las células endoteliales que comprenden los ventrículos laterales son ricas en mitocondrias (119,120), esto podría explicar su inmunopositividad para Panx1.

En este estudio también observamos que existe un aumento de la expresión de Panx1 en el ratón APP/PS1 respecto al WT en todo el cerebro, especialmente en el hipocampo, lo cual se condice con los resultados obtenidos en un estudio realizado anteriormente en nuestro laboratorio (86), en donde se realizó un estudio bioquímico para la cuantificación de proteínas, entre ellas Panx1, la cual se vio aumentada en el ratón APP/PS1. Como mencionamos anteriormente, en la EA suele aparecer un fenómeno de astrogliosis (121), donde hay un notorio aumento de astrocitos debido a la reacción inflamatoria generada por la deposición del péptido A β . Está descrito que los astrocitos expresan Panx1, por lo que un aumento en su cantidad sugiere una mayor expresión de Panx1.

También notamos otras diferencias más específicas entre cepas, como la expresión de Panx1 bordeando placas amiloides en el ratón APP/PS1. Esta curiosa observación podría deberse a que las placas amiloides, además de estar compuestas por A β , contienen restos celulares (4) que probablemente correspondan a restos de astrocitos y/o tipos neuronales que expresen Panx1.

El ratón APP/PS1 presentó además un aumento de astrocitos inmunopositivos a Panx1 con morfología reactiva en comparación al ratón WT, que presentaban una morfología normal. Todo esto observado tanto a nivel de corteza como de hipocampo y bordeando placas amiloides. Esto último coincide con los resultados obtenidos en un estudio donde también analizaron la expresión de Panx1 con técnicas inmunohistoquímicas, observando una sobreexpresión en aquellos astrocitos que se encontraban alrededor de placas amiloides, que corresponde a la única evidencia sobre la expresión de Panx1 en un modelo murino de la EA (115).

En este sentido, la sobreexpresión de Panx1 en el hipocampo del ratón APP/PS1 y su acumulación en neuronas y astrocitos reactivos cerca de las placas amiloides, sugiere su asociación con la toxicidad inducida por A β . De acuerdo con esta idea, se ha demostrado que

la aplicación de A β exógeno en cortes agudos del hipocampo produce muerte neuronal de una manera dependiente de la actividad de los hemicanales gliales y la activación neuronal de Panx1 (38). ¿Cómo el péptido A β podría promover una función aberrante de los canales Panx1? Según lo propuesto por Orellana y sus colaboradores, A β induce la activación de la microglía y la liberación de factores que promueven potencialmente el hemicanal de conexina y, en menor proporción, la apertura del canal Panx1 en los astrocitos, lo que provoca una liberación no regulada de moléculas de señalización, incluidos gliotransmisores como ATP y glutamato, que, a su vez, aumenta la excitabilidad neuronal y desencadena cascadas neurotóxicas (38,122).

6.3 PBN y astrocitos

Para poder observar la astrogliosis generada en la EA, realizamos técnicas de inmunofluorescencia para la detección de astrocitos mediante la utilización de un anticuerpo dirigido contra la proteína astrogial GFAP.

Las diferencias entre cepas fueron notorias, pues el ratón APP/PS1 presenta un mayor N° de astrocitos y además una morfología reactiva. Observamos también una astrogliosis más evidente en el ratón APP/PS1- PBN. Esto podría deberse al efecto del PBN, el cual es capaz de modificar la morfología neuronal y posiblemente astrocitaria mediante el bloqueo de Panx1. Se ha descrito que algunos procesos dependientes del citoesqueleto de actina, como la extensión neurítica y la formación de espinas dendríticas, se ven favorecidas con el bloqueo de los canales de Panx1. Además, Panx1 interactúa con la proteína Arp3, la cual forma parte de un complejo llamado Arp2/3, el cual participa en el proceso de polimerización de actina, favoreciendo la ramificación de las fibras de actina (87,123). Estos estudios podrían explicar el posible mecanismo por el cual tanto los astrocitos como las neuronas piramidales de CA1 modifican su morfología.

6.4 Signos neurodegenerativos

Como hemos mencionado anteriormente, la EA se caracteriza por presentar una neurodegeneración progresiva. Es por ello que decidimos realizar una cuantificación de somas de neuronas viables y no viables en la capa piramidal de CA1 del hipocampo, estructura fuertemente relacionada con procesos de aprendizaje y memoria (75,76). Este mismo tipo de análisis ha sido aplicado en diversos estudios (91,96). Uno de ellos fue realizado en ratas jóvenes, las que fueron inyectadas con A β a nivel intrahipocampal, observando cambios significativos en aquellos animales que fueron tratados con PBN, los cuales presentaron una disminución en el N° de células inviables, sugiriendo que el PBN podría ser una opción terapéutica para la EA (91).

Nuestros resultados arrojaron que los ratones APP/PS1, tanto tratados con PBN como con VEH, presentaron un porcentaje similar de células viables y de células inviables. Esto sugiere que la neurodegeneración presente en animales de 18 meses podría ser un daño irreversible, puesto que la enfermedad a esta edad se encuentra en una etapa muy avanzada, tomando en cuenta que los signos histopatológicos comienzan a aparecer a los 6 meses de edad (15) y el daño cognitivo y sináptico comienza mucho antes que la aparición de estos signos (35,77).

6.5 PBN en arborización dendrítica

Tanto en pacientes con EA como en ratones hay una pérdida de la morfología dendrítica neuronal (87), por lo mismo, es importante analizar el árbol dendrítico, ya que representa el 75% del volumen de una neurona y el 90% de su superficie; esto lo convierte en el principal blanco de los impulsos excitadores e inhibitorios (124).

El bloqueo de los canales de Panx1 con el fármaco PBN, induce cambios a nivel de arborización dendrítica (Figura 22.). La arborización dendrítica se correlaciona con el N° y distribución de entradas que cada neurona puede recibir y procesar (125–127).

Por otra parte, la actina y los microtúbulos son los principales componentes estructurales que subyacen la morfología dendrítica (87,123). Por lo tanto, Panx1 podría estar regulando la dinámica de la actina y los microtúbulos, y en consecuencia desencadenar cambios en la morfogénesis de las dendritas.

Respecto a los resultados obtenidos tras realizar la tinción de Golgi, los animales tratados con PBN presentaron un incremento en la complejidad de su árbol dendrítico que fue corroborado en el análisis de Sholl, donde en ambos animales se observó un aumento en la cantidad total de ramificaciones, independientemente de su cepa. Además, se observaron diferencias importantes respecto al orden dendrítico, donde a nivel de dendritas basales vimos significancia en la ramificación secundaria entre WT-VEH y WT-PBN, donde el animal tratado con PBN mostró un N° de intersecciones significativamente mayor respecto al tratado con VEH, y en general, todos los grupos presentan diferencias respecto al APP/PS1-VEH.

Nuestros resultados muestran que la arborización dendrítica se ve disminuida en el animal APP/PS1-VEH, y el PBN aumenta la arborización dendrítica en ambas cepas.

En un estudio realizado en este laboratorio, cuyo manuscrito se encuentra aún en preparación, se observaron cambios significativos en la morfología dendrítica de neuronas hipocampales de ratones que fueron sometidos a un tratamiento agudo con PBN, cuyos resultados arrojaron un patrón muy similar a lo observado en este estudio, destacando el aumento en la arborización dendrítica del ratón APP/PS1-PBN respecto al APP/PS1-VEH.

De acuerdo con la literatura, el PBN juega un rol importante en distintos aspectos, entre ellos la viabilidad celular (91,96), la arborización dendrítica (87,123), inflamación por A β (38), etc., condiciones donde ejerce un efecto beneficioso, pero ¿por qué los resultados obtenidos en este estudio no fueron los esperados? Teniendo en cuenta que nuestra hipótesis es que el fármaco PBN inhibe los canales de Panx1 disminuyendo las alteraciones, tanto cognitivas como morfológicas cerebrales, inducidas por el A β en la EA, existe un gran N° de factores que podrían ser considerados.

Para este estudio seleccionamos animales de 18 meses de edad, que a pesar de que esto aumente la probabilidad de presenciar los signos histopatológicos de la EA, podría ser

considerado a la vez un factor en contra, ya que, al encontrarse en una etapa avanzada de la enfermedad, probablemente el nivel de daño es tan avanzado que resulta irreversible.

Otro factor importante a considerar es la cantidad de animales usados en el estudio. Puesto que el N° de animales muy bajo fue dificultoso obtener resultados estadísticamente significativos. Además, existían animales cuyos performances contrastaban notoriamente respecto a los demás animales que pertenecían al mismo grupo experimental. Un dato curioso aportado por el investigador donante de la cepa APP^{swe}/PSEN1 Δ E9 (15), es que la cantidad de placas amiloides se ve afectada tanto por el sexo del animal como por su edad. Las hembras mayores a los 7 meses presentan una disparidad en la carga A β , aunque en la corteza cerebral no se vieron diferencias en la cantidad de placas, a nivel de cerebelo se observó un aumento de 5 a 10 veces del péptido. Tradicionalmente, el cerebelo se ha considerado como una estructura que participa esencialmente en la coordinación y el control motor. Sin embargo, abundante evidencia sugiere que el cerebelo tiene funciones más amplias que las puramente motoras. En general, el daño cerebeloso en pacientes se ha asociado con alteraciones en funciones ejecutivas, aprendizaje, memoria procedimental y declarativa, procesamiento del lenguaje y funciones visuoespaciales (128–137). En un estudio realizado en pacientes sanos, se midió la actividad cerebral con pruebas de memoria de reconocimiento, identificando un aumento de la actividad a nivel cortical y de cerebelo, específicamente en vermis, lo que sugiere que la disfunción de este órgano podría afectar este tipo de memoria. Esto podría explicar el inesperado performance de uno de los ratones APP/PS1, puesto que, al ser macho, es probable que la cantidad de placas amiloides en su cerebelo sea menor que sus pares, y en consecuencia su déficit cognitivo sea menor, al menos con relación a la memoria de reconocimiento.

En cuanto al uso del fármaco PBN, existen estudios en donde se ha administrado mediante una inyección intrahipocampal (91), mientras que en otros se ha incubado junto con A β en cultivos celulares (38). Por otro lado, en nuestro laboratorio se ha utilizado en incubación junto con LCA en cerebros postmortem (resultados que aún no han sido publicados). Estos datos indican que sólo existe evidencia de su uso como tratamiento agudo, pero no como tratamiento crónico, así como tampoco su administración por vía oral. Es por

ello que, al utilizar esta nueva forma de administración, nos surgen dudas respecto a si la vía, la dosis administrada y el periodo de tratamiento fueron realmente los indicados.

Finalmente, creemos necesario realizar un futuro estudio, utilizando un mayor N° de animales, que se encuentren en una etapa más temprana de la enfermedad, con el fin de observar si el tratamiento con PBN podría tener un rol preventivo en el daño cognitivo y sináptico producido en la EA.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

1. El tratamiento con PBN es capaz de revertir las alteraciones en la memoria de ratones transgénicos APP/PS1.
2. El tratamiento con PBN es capaz de inducir cambios en la arborización dendrítica de las neuronas piramidales de CA1, generando un incremento en la complejidad de su árbol dendrítico en ratones WT y APP/PS1.
3. El ratón APP/PS1 tiene una mayor expresión de Panx1, en comparación al WT.
4. El tratamiento con PBN no genera cambios en la expresión de Panx1.
5. Panx1 se localiza en vasos sanguíneos, citoplasma de células endoteliales del ventrículo lateral y membrana de neuronas corticales, la que aumenta a partir de la capa granular externa, tanto en ratones WT como APP-PS1.
6. El tratamiento con PBN no es capaz de revertir el daño neurodegenerativo en neuronas de animales APP/PS1.

CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Cummings JL. Alzheimer's Disease. N Engl J Med [Internet]. julio de 2004;351(1):56–67. Disponible en: <https://doi.org/10.1056/NEJMra040223>
2. Investigación Boreal - Consultoría Ltda. Estudio de Recopilacion, Sistematizacion y Descripcion de Información Eestadistica Dispoble Sobre Vejez y Envejecimiento en Chile. 2011;
3. Martin Prince. World Alzheimer Report. 2015; Disponible en: <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2015.pdf>
4. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: Genes, proteins, and therapy. Physiological Reviews. 2001.
5. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. Science. 2002.
6. Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, et al. Physical basis of cognitive alterations in alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. Ann Neurol. 1991;
7. Gralle M, Ferreira ST. Structure and functions of the human amyloid precursor protein: The whole is more than the sum of its parts. Progress in Neurobiology. 2007.
8. LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. Nat Rev Neurosci [Internet]. 1 de julio de 2007;8:499. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nrn2168>
9. Slooter AJC, van Duijn CM. Genetic Epidemiology of Alzheimer Disease. Epidemiol Rev [Internet]. 1 de marzo de 1997;19(1):107–19. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a017933>
10. Price DL, Sisodia SS. MUTANT GENES IN FAMILIAL ALZHEIMER'S DISEASE

- AND TRANSGENIC MODELS. *Annu Rev Neurosci* [Internet]. 1 de marzo de 1998;21(1):479–505. Disponible en: <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.21.1.479>
11. Thomas P, Fenech M. A review of genome mutation and Alzheimer's disease. *Mutagenesis* [Internet]. 1 de enero de 2007;22(1):15–33. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/mutage/gel055>
 12. Goate A, Chartier-Harlin M-C, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* [Internet]. 1991;349(6311):704–6. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/349704a0>
 13. Hock BJ, Lamb BT. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Trends Genet* [Internet]. 1 de octubre de 2001 [citado 10 de septiembre de 2019];17(10):S7–12. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168952501024490>
 14. Ashe KH, Zahs KR. Probing the Biology of Alzheimer's Disease in Mice. *Neuron*. 2010.
 15. Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins NA, et al. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β -amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific γ secretase. *Hum Mol Genet* [Internet]. noviembre de 2003;13(2):159–70. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh019>
 16. Selkoe DJ. Alzheimer's Disease Is a Synaptic Failure. *Science* (80-) [Internet]. 25 de octubre de 2002;298(5594):789 LP – 791. Disponible en: <http://science.sciencemag.org/content/298/5594/789.abstract>
 17. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease and Down's syndrome: Sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984;
 18. Goldgaber D, Lerman MI, McBride OW, Saffiotti U, Gajdusek DC. Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* (80-). 1987;

19. Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GA, St George-Hyslop P, Van Keuren ML, et al. Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* (80-) [Internet]. 20 de febrero de 1987;235(4791):880 LP – 884. Disponible en: <http://science.sciencemag.org/content/235/4791/880.abstract>
20. Janus C, Chishti MA, Westaway D. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 26 de julio de 2000 [citado 10 de septiembre de 2019];1502(1):63–75. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443900000338?via%3Dihub>
21. Ashe KH. Learning and memory in transgenic mice modeling Alzheimer's disease. *Learn Mem*. 2001;8(6):301–8.
22. Gotz J, Ittner LM. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci*. julio de 2008;9(7):532–44.
23. Duyckaerts C, Potier M-C, Delatour B. Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol*. enero de 2008;115(1):5–38.
24. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*. julio de 2003;39(3):409–21.
25. Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva J V, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, et al. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*. abril de 2002;416(6880):535–9.
26. Klyubin I, Betts V, Welzel AT, Blennow K, Zetterberg H, Wallin A, et al. Amyloid beta protein dimer-containing human CSF disrupts synaptic plasticity: prevention by systemic passive immunization. *J Neurosci*. abril de 2008;28(16):4231–7.
27. Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, et al. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med*. agosto de 2008;14(8):837–42.

28. Price JL, Morris JC. Tangles and plaques in nondemented aging and “preclinical” Alzheimer’s disease. *Ann Neurol.* marzo de 1999;45(3):358–68.
29. Lee H, Zhu X, Castellani RJ, Nunomura A, Perry G, Smith MA. Amyloid-beta in Alzheimer disease: the null versus the alternate hypotheses. *J Pharmacol Exp Ther.* junio de 2007;321(3):823–9.
30. Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, Kotilinek L, Kawarabayashi T, Younkin LH, et al. The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer’s disease. *J Neurosci.* marzo de 2002;22(5):1858–67.
31. Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM. Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer’s disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron.* marzo de 2005;45(5):675–88.
32. Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer’s amyloid β -peptide. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2007.
33. Glabe CG. Structural classification of toxic amyloid oligomers. *J Biol Chem.* octubre de 2008;283(44):29639–43.
34. Klein WL, Krafft GA, Finch CE. Targeting small A β oligomers: The solution to an Alzheimer’s disease conundrum? *Trends in Neurosciences.* 2001.
35. Walsh DM, Selkoe DJ. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer’s disease. *Neuron.* 2004.
36. Cummings BJ, Pike CJ, Shankle R, Cotman CW. Beta-amyloid deposition and other measures of neuropathology predict cognitive status in Alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging.* 1996;17(6):921–33.
37. Knowles RB, Gomez-Isla T, Hyman BT. Abeta associated neuropil changes: correlation with neuronal loss and dementia. *J Neuropathol Exp Neurol.* diciembre de 1998;57(12):1122–30.
38. Orellana JA, Shoji KF, Abudara V, Ezan P, Amigou E, Sáez PJ, et al. Amyloid β -induced death in neurons involves glial and neuronal hemichannels. *J Neurosci.* 2011;

39. Thompson RJ, MacVicar BA. Connexin and pannexin hemichannels of neurons and astrocytes. *Channels*. 2008.
40. Decrock E, De Bock M, Wang N, Bultynck G, Giaume C, Naus CC, et al. Connexin and pannexin signaling pathways, an architectural blueprint for CNS physiology and pathology? *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015.
41. Shestopalov VI, Slepak VZ. Molecular pathways of pannexin1-mediated neurotoxicity. *Front Physiol*. 2014;5:23.
42. Barbe MT, Monyer H, Bruzzone R. Cell-cell communication beyond connexins: the pannexin channels. *Physiology (Bethesda)*. abril de 2006;21:103–14.
43. Penuela S, Gehi R, Laird DW. The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 2013.
44. Kevenaar JT, Hoogenraad CC. The axonal cytoskeleton: From organization to function. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2015.
45. Kennedy MB. Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science*. 2000.
46. Gong Y, Chang L, Viola KL, Lacor PN, Lambert MP, Finch CE, et al. Alzheimer's disease-affected brain: Presence of oligomeric A β ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;
47. Georganopoulou DG, Chang L, Nam JM, Thaxton CS, Mufson EJ, Klein WL, et al. Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;
48. Fukumoto H, Tokuda T, Kasai T, Ishigami N, Hidaka H, Kondo M, et al. High-molecular-weight β -amyloid oligomers are elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. *FASEB J*. 2010;
49. Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, et al. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β ₁₋₄₂ are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;
50. Benilova I, De Strooper B. Promiscuous Alzheimer's amyloid: Yet another partner.

Science. 2013.

51. Jacobsen JS, Wu CC, Redwine JM, Comery TA, Arias R, Bowlby M, et al. Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;
52. Larson ME, Lesné SE. Soluble A β oligomer production and toxicity. *Journal of Neurochemistry*. 2012.
53. Zempel H, Mandelkow EM. Linking amyloid- β and tau: Amyloid- β induced synaptic dysfunction via local wreckage of the neuronal cytoskeleton. *Neurodegener Dis*. 2012;
54. Um JW, Nygaard HB, Heiss JK, Kostylev MA, Stagi M, Vortmeyer A, et al. Alzheimer amyloid-beta oligomer bound to postsynaptic prion protein activates Fyn to impair neurons. *Nat Neurosci*. septiembre de 2012;15(9):1227–35.
55. Pozueta J, Lefort R, Shelanski ML. Synaptic changes in Alzheimer's disease and its models. *Neuroscience*. octubre de 2013;251:51–65.
56. Lacor PN, Buniel MC, Chang L, Fernandez SJ, Gong Y, Viola KL, et al. Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid beta oligomers. *J Neurosci*. noviembre de 2004;24(45):10191–200.
57. Renner M, Lacor PN, Velasco PT, Xu J, Contractor A, Klein WL, et al. Deleterious effects of amyloid beta oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5. *Neuron*. junio de 2010;66(5):739–54.
58. Um JW, Kaufman AC, Kostylev M, Heiss JK, Stagi M, Takahashi H, et al. Metabotropic glutamate receptor 5 is a coreceptor for Alzheimer abeta oligomer bound to cellular prion protein. *Neuron*. septiembre de 2013;79(5):887–902.
59. Sheng M, Sabatini BL, Südhof TC. Synapses and Alzheimer's disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;
60. Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*. octubre de 1988;1(8):623–34.
61. Olney JW. Inciting excitotoxic cytochrome among central neurons. *Adv Exp Med Biol*.

- 1986;203:631–45.
62. Citri A, Malenka RC. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology*. enero de 2008;33(1):18–41.
 63. Weilinger NL, Maslieieva V, Bialecki J, Sridharan SS, Tang PL, Thompson RJ. Iontropic receptors and ion channels in ischemic neuronal death and dysfunction. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2013.
 64. Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, et al. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci*. agosto de 2005;8(8):1051–8.
 65. Hsieh H, Boehm J, Sato C, Iwatsubo T, Tomita T, Sisodia S, et al. AMPAR Removal Underlies A β -Induced Synaptic Depression and Dendritic Spine Loss. *Neuron*. 2006;
 66. Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, et al. A β oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2007;
 67. Perez-Cruz C, Nolte MW, Van Gaalen MM, Rustay NR, Termont A, Tanghe A, et al. Reduced spine density in specific regions of CA1 pyramidal neurons in two transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2011;
 68. Kommaddi RP, Das D, Karunakaran S, Nanguneri S, Bapat D, Ray A, et al. A β mediates F-actin disassembly in dendritic spines leading to cognitive deficits in alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2018;
 69. Forrest MP, Parnell E, Penzes P. Dendritic structural plasticity and neuropsychiatric disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 2018.
 70. Weilinger NL, Lohman AW, Rakai BD, Ma EMM, Bialecki J, Maslieieva V, et al. Metabotropic NMDA receptor signaling couples Src family kinases to pannexin-1 during excitotoxicity. *Nat Neurosci*. marzo de 2016;19(3):432–42.
 71. Thompson RJ, Zhou N, MacVicar BA. Ischemia opens neuronal gap junction hemichannels. *Science* (80-). 2006;

72. Thompson RJ, Jackson MF, Olah ME, Rungta RL, Hines DJ, Beazely MA, et al. Activation of pannexin-1 hemichannels augments aberrant bursting in the hippocampus. *Science* (80-). 2008;
73. Lindeboom J, Weinstein H. Neuropsychology of cognitive ageing, minimal cognitive impairment, Alzheimer's disease, and vascular cognitive impairment. *Eur J Pharmacol.* abril de 2004;490(1-3):83-6.
74. Riepe MW. Cholinergic treatment: what are the early neuropathological targets? *Eur J Neurol.* octubre de 2005;12 Suppl 3:3-9.
75. Squire LR, Zola SM. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* noviembre de 1996;93(24):13515-22.
76. Squire LR, Wixted JT, Clark RE. Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. *Nat Rev Neurosci.* noviembre de 2007;8(11):872-83.
77. King DL, Arendash GW, Crawford F, Sterk T, Menendez J, Mullan MJ. Progressive and gender-dependent cognitive impairment in the APP(SW) transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *Behav Brain Res.* septiembre de 1999;103(2):145-62.
78. Hsia AY, Masliah E, McConlogue L, Yu GQ, Tatsuno G, Hu K, et al. Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A.* marzo de 1999;96(6):3228-33.
79. McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, et al. Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* diciembre de 1999;46(6):860-6.
80. Koistinaho M, Ort M, Cimadevilla JM, Vondrous R, Cordell B, Koistinaho J, et al. Specific spatial learning deficits become severe with age in β -amyloid precursor protein transgenic mice that harbor diffuse β -amyloid deposits but do not form plaques. *Proc Natl Acad Sci [Internet].* 4 de diciembre de 2001;98(25):14675 LP - 14680. Disponible en: <http://www.pnas.org/content/98/25/14675.abstract>
81. Van Dam D, D'Hooge R, Staufenbiel M, Van Ginneken C, Van Meir F, De Deyn PP. Age-dependent cognitive decline in the APP23 model precedes amyloid deposition.

- Eur J Neurosci. enero de 2003;17(2):388–96.
82. Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, et al. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci.* enero de 2005;8(1):79–84.
 83. Reed MN, Hofmeister JJ, Jungbauer L, Welzel AT, Yu C, Sherman MA, et al. Cognitive effects of cell-derived and synthetically derived Abeta oligomers. *Neurobiol Aging.* octubre de 2011;32(10):1784–94.
 84. Prochnow N, Abdulazim A, Kurtenbach S, Wildförster V, Dvorianchikova G, Hanske J, et al. Pannexin1 Stabilizes Synaptic Plasticity and Is Needed for Learning. *PLoS One.* 2012;
 85. Ardiles AO, Flores-Muñoz C, Toro-Ayala G, Cárdenas AM, Palacios AG, Muñoz P, et al. Pannexin 1 regulates bidirectional hippocampal synaptic plasticity in adult mice. *Front Cell Neurosci.* 2014;
 86. Gajardo I, Salazar CS, Lopez-Espíndola D, Estay C, Flores-Muñoz C, Elgueta C, et al. Lack of pannexin 1 alters synaptic GluN2 subunit composition and spatial reversal learning in mice. *Front Mol Neurosci.* 2018;
 87. Wicki-Stordeur LE, Boyce AKJ, Swayne LA. Analysis of a pannexin 2-pannexin 1 chimeric protein supports divergent roles for pannexin C-termini in cellular localization. *Cell Commun Adhes.* agosto de 2013;20(3–4):73–9.
 88. Robbins N, Koch SE, Tranter M, Rubinstein J. The history and future of probenecid. *Cardiovascular Toxicology.* 2012.
 89. Cunningham RF, Israili ZH, Dayton PG. Clinical Pharmacokinetics of Probenecid. *Clin Pharmacokinet.* 1981;
 90. Silverman W, Locovei S, Dahl G. Probenecid, a gout remedy, inhibits pannexin 1 channels. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2008;
 91. Carrillo-Mora P, Méndez-Cuesta LA, Pérez-De La Cruz V, Fortoul-van Der Goes TI, Santamaría A. Protective effect of systemic l-kynurenine and probenecid

- administration on behavioural and morphological alterations induced by toxic soluble amyloid beta (25-35) in rat hippocampus. *Behav Brain Res.* 2010;
92. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res.* noviembre de 1988;31(1):47–59.
 93. Zaqout S, Kaindl AM. Golgi-Cox Staining Step by Step. *Front Neuroanat.* 2016;
 94. Scheff SW, Price DA. Synaptic pathology in Alzheimer’s disease: a review of ultrastructural studies. *Neurobiol Aging.* diciembre de 2003;24(8):1029–46.
 95. Buckner RL. Memory and executive function in aging and AD: multiple factors that cause decline and reserve factors that compensate. *Neuron.* septiembre de 2004;44(1):195–208.
 96. Orta-Salazar E, Feria-Velasco AI, Díaz-Cintra S. Alteraciones en la corteza motora primaria en la enfermedad de Alzheimer: estudio en el modelo 3xTg-AD. *Neurología [Internet].* 1 de septiembre de 2019 [citado 10 de septiembre de 2019];34(7):429–36. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213485317301548>
 97. Price KA, Varghese M, Sowa A, Yuk F, Brautigam H, Ehrlich ME, et al. Altered synaptic structure in the hippocampus in a mouse model of Alzheimer’s disease with soluble amyloid- β oligomers and no plaque pathology. *Mol Neurodegener.* 2014;
 98. Baglietto-Vargas D, Prieto GA, Limon A, Forner S, Rodriguez-Ortiz CJ, Ikemura K, et al. Impaired AMPA signaling and cytoskeletal alterations induce early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Aging Cell.* 2018;
 99. Miñano-Molina AJ, España J, Martín E, Barneda-Zahonero B, Fadó R, Solé M, et al. Soluble oligomers of amyloid- β peptide disrupt membrane trafficking of α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor contributing to early synapse dysfunction. *J Biol Chem.* 2011;
 100. MacVicar BA, Thompson RJ. Non-junction functions of pannexin-1 channels. *Trends in Neurosciences.* 2010.

101. Hainz N, Wolf S, Beck A, Wagenpfeil S, Tschernig T, Meier C. Probenecid arrests the progression of pronounced clinical symptoms in a mouse model of multiple sclerosis. *Sci Rep*. 2017;
102. Wei R, Wang J, Xu Y, Yin B, He F, Du Y, et al. Probenecid protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting lysosomal and inflammatory damage in rats. *Neuroscience*. 2015;
103. Zhang Z, Lei Y, Yan C, Mei X, Jiang T, Ma Z, et al. Probenecid Relieves Cerebral Dysfunction of Sepsis by Inhibiting Pannexin 1-Dependent ATP Release. *Inflammation* [Internet]. junio de 2019;42(3):1082–92. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10753-019-00969-4>
104. Wu HY, Hudry E, Hashimoto T, Kuchibhotla K, Rozkalne A, Fan Z, et al. Amyloid β induces the morphological neurodegenerative triad of spine loss, dendritic simplification, and neuritic dystrophies through calcineurin activation. *J Neurosci*. 2010;
105. Lu N, Dubreuil M, Zhang Y, Neogi T, Rai SK, Ascherio A, et al. Gout and the risk of Alzheimer's disease: a population-based, BMI-matched cohort study. *Ann Rheum Dis*. marzo de 2016;75(3):547–51.
106. Bucher JR, Huff J, Kluwe WM. Toxicology and carcinogenesis studies of isophorone in F344 rats and B6C3F1 mice. *Toxicology*. 1986;39(2):207–19.
107. Christy AC, Byrnes KR, Settle TL. Evaluation of medicated gel as a supplement to providing acetaminophen in the drinking water of C57BL/6 mice after surgery. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. marzo de 2014;53(2):180–4.
108. Yesavage JA, Brooks JO 3rd, Taylor J, Tinklenberg J. Development of aphasia, apraxia, and agnosia and decline in Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry*. mayo de 1993;150(5):742–7.
109. Lalonde R, Lewis TL, Strazielle C, Kim H, Fukuchi K. Transgenic mice expressing the betaAPP695SWE mutation: effects on exploratory activity, anxiety, and motor coordination. *Brain Res*. julio de 2003;977(1):38–45.

110. Bruzzone R, Hormuzdi SG, Barbe MT, Herb A, Monyer H. Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;
111. Ray A, Zoidl G, Weickert S, Wahle P, Dermietzel R. Site-specific and developmental expression of pannexin1 in the mouse nervous system. *Eur J Neurosci*. 2005;
112. Vogt A, Hormuzdi SG, Monyer H. Pannexin1 and Pannexin2 expression in the developing and mature rat brain. *Mol Brain Res*. 2005;
113. Weickert S, Ray A, Zoidl G, Dermietzel R. Expression of neural connexins and pannexin1 in the hippocampus and inferior olive: A quantitative approach. *Mol Brain Res*. 2005;
114. Zoidl G, Petrasch-Parwez E, Ray A, Meier C, Bunse S, Habbes HW, et al. Localization of the pannexin1 protein at postsynaptic sites in the cerebral cortex and hippocampus. *Neuroscience*. 2007;
115. Yi C, Mei X, Ezan P, Mato S, Matias I, Giaume C, et al. Astroglial connexin43 contributes to neuronal suffering in a mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Death Differ*. octubre de 2016;23(10):1691–701.
116. Gordon GRJ, Mulligan SJ, MacVicar BA. Astrocyte control of the cerebrovasculature. *GLIA*. 2007.
117. Iadecola C, Nedergaard M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nature Neuroscience*. 2007.
118. Koehler RC, Roman RJ, Harder DR. Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends in Neurosciences*. 2009.
119. Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Doetsch1997.pdf. 1997;17(13):5046–61.
120. Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Neural Stem Cells Confer Unique Pinwheel Architecture to the Ventricular Surface in Neurogenic Regions of the Adult Brain. *Cell Stem Cell*. 2008;
121. Perez-Nievas BG, Serrano-Pozo A. Deciphering the astrocyte reaction in Alzheimer's

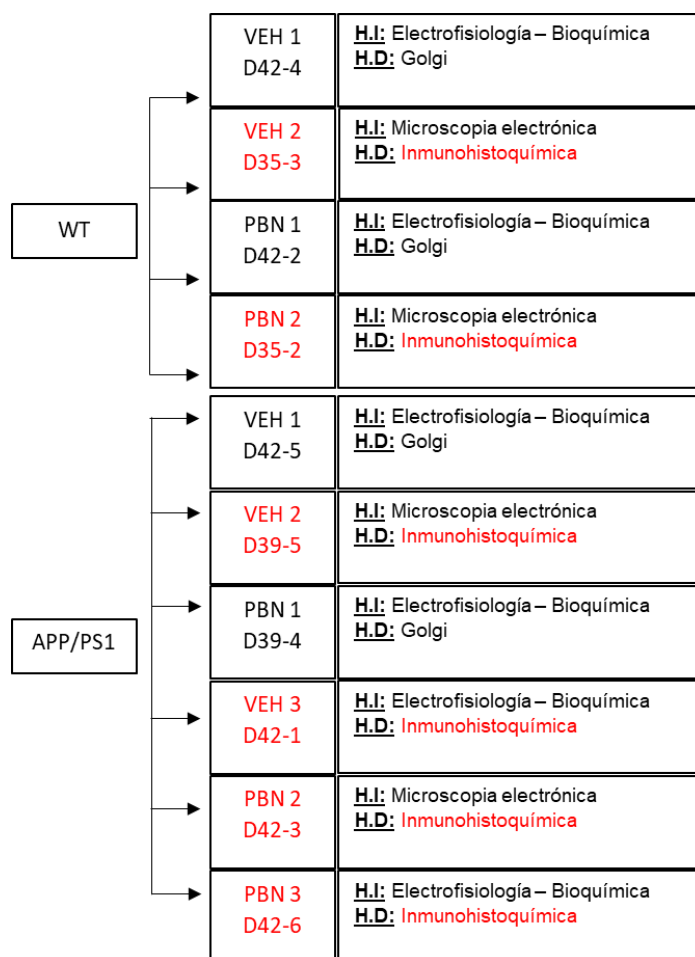
- disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2018.
122. Orellana JA, Froger N, Ezan P, Jiang JX, Bennett MVL, Naus CC, et al. ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels. *J Neurochem*. 2011;
 123. Sanchez-Arias JC, Liu M, Choi CSW, Ebert SN, Brown CE, Swayne LA. Pannexin 1 Regulates Network Ensembles and Dendritic Spine Development in Cortical Neurons. *eNeuro*. 2019;6(3).
 124. Jagadha V, Becker LE. Dendritic Pathology: An Overview of Golgi Studies in Man. *Can J Neurol Sci / J Can des Sci Neurol*. 1989;
 125. Parrish JZ, Emoto K, Kim MD, Jan YN. Mechanisms that Regulate Establishment, Maintenance, and Remodeling of Dendritic Fields. *Annu Rev Neurosci*. 2007;
 126. Urbanska M, Blazejczyk M, Jaworski J. Molecular basis of dendritic arborization. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 2008.
 127. Yang G, Pan F, Gan WB. Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature*. 2009;
 128. Bracke-Tolkmitt R, Linden A, Canavan AGM, Rockstroh B, Scholz E, Wessel K, et al. The Cerebellum Contributes to Mental Skills. *Behav Neurosci*. 1989;
 129. Wallesch CW, Horn A. Long-term effects of cerebellar pathology on cognitive functions. *Brain Cogn*. 1990;
 130. Grafman J, Litvan I, Massaquoi S, Stewart M, Sirigu A, Hallett M. Cognitive planning deficit in patients with cerebellar atrophy. *Neurology*. 1992;
 131. Akshoomoff NA, Courchesne E, Press GA, Iragui V. Contribution of the cerebellum to neuropsychological functioning: Evidence from a case of cerebellar degenerative disorder. *Neuropsychologia*. 1992;
 132. Pascual-Leone A, Grafman J, Clark K, Stewart M, Massaquoi S, Lou J -S, et al. Procedural learning in Parkinson's disease and cerebellar degeneration. *Ann Neurol*. 1993;

133. Appollonio IM, Grafman J, Schwartz V, Massaquoi S, Hallett M. Memory in patients with cerebellar degeneration. *Neurology*. 1993;
134. Silveri MC, Leggio MG, Molinari M. The cerebellum contributes to linguistic production: A case of agrammatic speech following a right cerebellar lesion. *Neurology*. 1994;
135. Molinari M, Leggio MG, Solida A, Ciorra R, Misciagna S, Silveri MC, et al. Cerebellum and procedural learning: Evidence from focal cerebellar lesions. *Brain*. 1997;
136. Doyon J, Gaudreau D, Laforce RL, Castonguay M, Bédard PJ, Bédard F, et al. Role of the striatum, cerebellum, and frontal lobes in the learning of a visuomotor sequence. *Brain Cogn*. 1997;
137. Schmahmann JD, Sherman JC. The cerebellar cognitive affective syndrome. *Brain*. 1998;

CAPÍTULO 9. ANEXOS

Anexo 1: Animales en conducta y tratamiento.

| | | | | |
|-------|-----|----------|----------|--------------|
| D42-5 | VEH | ♂ macho | APP PSEN | FN: 12/01/16 |
| D42-4 | VEH | ♂ macho | APP WT | FN: 12/01/16 |
| D35-3 | VEH | ♀ hembra | APP WT | FN: 11/10/16 |
| D42-3 | PBN | ♂ macho | APP PSEN | FN: 12/01/16 |
| D42-1 | VEH | ♂ macho | APP PSEN | FN: 12/01/16 |
| D42-2 | PBN | ♂ macho | APP WT | FN: 12/01/16 |
| D39-4 | PBN | ♀ hembra | APP PSEN | FN: 11/17/16 |
| D39-5 | VEH | ♀ hembra | APP PSEN | FN: 11/17/16 |
| D42-6 | PBN | ♂ macho | APP PSEN | FN: 12/01/16 |
| D35-2 | PBN | ♀ hembra | APP WT | FN: 11/10/16 |



Anexo 2: Preparación Probenecid para Medigel

1 copa de Medigel sucralosa → 50 μl

*usamos PBN a 100mg/kg/día

*peso ratón promedio: 40grs

100 mg/kg/día → 100 x 0,04 kg

→ 4 mg PBN /día/ratón

*1 ratón consume 4 ml de Medigel sucralosa por día

→ 4 mg PBN / 4 ml Medigel → 1 mg/ml PBN por día

1 copa Medigel 50 mL → 50 mL x 1 mg/ml

→ 50 mg PBN/copa

PM PBN: 285,36 gr/mol

$$\boxed{\frac{M = n}{V}} \rightarrow \frac{\text{Gramos PBN}}{\text{PM PBN} \times 50 \text{ mL}} \rightarrow \frac{5 \times 10 \text{ g}}{285,36 \text{ g/mol} \times 0,05 \text{ L}} \rightarrow \frac{0,05}{14,268}$$

$$\rightarrow 0,0035 \text{ M} \rightarrow \boxed{3,5 \text{ mM PBN}}$$

Preparación Solución Stock de PBN 175 mM

$$\boxed{C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2}$$

$$175 \text{ mM} \times V_1 = 3,5 \text{ mM} \times 50 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ mL}$$

→ 1 mL de Stock PBN

-Tomar 500 mL de PBN Stock (350 ml) y agregar con jeringa de tuberculina a la copa de Medigel y agitar rigurosamente.

-Preparación de PBN Stock 175 mM 50mL en NaOH 1M

$$\text{gr} = M \times \text{PM} \times v$$

$$\rightarrow \frac{0,175 \text{ mol}}{\text{L}} \times \frac{285,36 \text{ gr}}{\text{mol}} \times 0,05 \text{ L}$$

$$\rightarrow 2,5 \text{ gr PBN (5 gr PBN / 100mL NaOH)}$$

Preparación solución NaOH 1M 100mL

$$\text{gr} = M \times \text{PM} \times v$$

$$* \text{PM} = 40 \text{ gr/mol}$$

$$\text{gr} = \frac{1 \text{ mol}}{\text{L}} \times 40 \text{ gr} \times 0,1 \text{ L}$$

$$\text{gr} = 4 \text{ gr NaOH}$$

*4 gr de NaOH se diluyen en 50 mL de H₂O_d (50 mL) en agitador magnético y luego aforar a 100 mL.

*5 gr de PBN, se diluyen en 50 mL de NaOH 1M, en agitador magnético, aforar a 100 mL y luego agregar 1 gota de colorante de alimentos “gourmet” color rojo.

-Alicuotar a 1 mL en tubos eppendorf, rotulados y manteniendo en oscuridad a 4°C.

*Se preparan 100 mL más de NaOH 1M para utilizar como VEH en Medigel para animales que no tendrán tratamiento con PBN.

Anexo 3: Procesamiento de muestra

1) DESHIDRATACIÓN

- Alcohol 50 30 min
- Alcohol 70 30 min
- Alcohol 80 30 min
- Alcohol 95 I 30 min
- Alcohol 95 II 30 min
- Alcohol 100 I 30 min
- Alcohol 100 II 30 min
- Alcohol 100 III 30 min

2) ACLARAMIENTO

- Xilol I 15 min
- Xilol II 15 min
- Xilol III 15 min

3) IMPREGNACION

- Parafina I 30 min
- Parafina II 30 min
- Parafina III 30 min

Anexo 4: Protocolo Hematoxilina – Eosina

1) Desparafinación:

- Xilol I (10 min)
- Xilol II (10 min)
- Xilol III (10 min)

2) Rehidratación:

- Alcohol 100% I (5 min)
- Alcohol 100% II (5 min)
- Alcohol 95% (5 min)
- Alcohol 70% (5 min)

3) Lavado en agua destilada durante 5 min.

4) Coloración con Hematoxilina de Harris (30 seg)

5) Viraje en agua corriente (10 min)

6) Eosina alcohólica (4 seg)

7) Deshidratación:

- Alcohol 100% I (5 min)
- Alcohol 100% II (5 min)
- Alcohol /Xilol (5min)

8) Aclaramiento:

- Xilol I (10 min)
- Xilol II (10 min)

9) Cubrir con medio de montaje DPX

Anexo 5: Protocolo Rojo congo

1) Desparafinación:

- Xilol I (10 min)
- Xilol II (10 min)
- Xilol III (10 min)

2) Rehidratación:

- Alcohol 100% I (5 min)
- Alcohol 100% II (5 min)
- Alcohol 95% (5 min)
- Alcohol 70% (5 min)

3) Lavado en agua destilada durante 5 min.

4) Coloración con Rojo Congo al 5% en alcohol 50% en H₂O (5 min)

5) Hidróxido de potasio KOH al 0.2% en alcohol 80% (3 min)

6) Lavado rápido en agua

7) Contraste con Hematoxilina de Harris (2 min)

8) Deshidratación (rápida):

- Alcohol 100% I (dipping)
- Alcohol 100% II (dipping)
- Alcohol /Xilol (dipping)

9) Aclaramiento:

- Xilol I (10 min)
- Xilol II (10 min)

9) Cubrir con medio de montaje DPX

Anexo 6: Protocolo Golgi - Cox

- 1) Los animales experimentales deben ser profundamente anestesiados antes de matarlos. El cerebro del animal se debe extraer del cráneo lo más rápido posible.
 - 2) Enjuague el tejido rápidamente en agua destilada doble o Milli-Q para eliminar la sangre de la superficie.
 - 3) Sumerja el tejido en la solución de impregnación, mezclando volúmenes iguales de soluciones A y B, y almacene a temperatura ambiente durante 2 semanas en la oscuridad
- *. Reemplace la solución de impregnación después de las primeras 6 horas de inmersión o al día siguiente
- 4) Transfiera el tejido a la Solución C y almacénelo a temperatura ambiente en la oscuridad durante al menos 72 horas (hasta 1 semana). Reemplácelo al menos una vez después de las primeras 24 horas de inmersión o al día siguiente.
 - 5) Las secciones de 150 μm se pueden cortar mejor en un criostato a una temperatura de -20°C . Cada sección debe transferirse con un recuperador de muestras de vidrio (incluido) y montarse en portaobjetos de microscopio recubiertos de gelatina con Solución C. Para obtener los mejores resultados, las secciones se deben procesar lo antes posible, pero se pueden almacenar en una caja de diapositivas a temperatura ambiente en la oscuridad durante un máximo de 3 días.

Procedimiento de tinción

- 1) Enjuague las secciones en agua destilada doble o Milli-Q 2 veces, 4 minutos cada una.
- 2) Coloque las secciones en una mezcla que consta de:
 - 1 parte de Solución D
 - 1 parte de Solución E

- 2 partes de agua destilada doble o Milli-Q durante 10 minutos.

3) Enjuague las secciones en agua destilada doble o Milli-Q 2 veces, 4 minutos cada una.

4) Deshidratación:

- Alcohol 50° (4 minutos)
- Alcohol 75° (4 minutos)
- Alcohol 95° (4 minutos)
- Alcohol 100° I (4 minutos)
- Alcohol 100° II (4 minutos)
- Alcohol 100° III (4 minutos)
- Alcohol 100° IV (4 minutos)

5) Aclaramiento:

- Xilol I (4 minutos)
- Xilol II (4 minutos)
- Xilol III (4 minutos)

6) Cubrir con DPX

Anexo 7: Protocolo Cresil violeta

1) Desparafinación:

- Xilol I (10 min)
- Xilol II (10 min)
- Xilol III (10 min)

2) Rehidratación:

- Alcohol 100% I (5 min)
- Alcohol 100% II (5 min)
- Alcohol 95% (5 min)

3) Lavar en agua destilada (5 min)

4) Mantener la preparación 10 minutos en la solución de cresil violeta. Para ello, filtrar y precalentar la solución de cresil violeta a 57° C inmediatamente antes de usar.

5) Deshidratación:

- Alcohol 96° C en varios cambios (hasta eliminar el exceso de colorante)
- Alcohol 100% I (5 min)
- Alcohol 100% II (5 min)
- Alcohol /Xilol (5min)

6) Aclaramiento:

- Xilol I (10 min)
- Xilol II (10 min)

7) Cubrir con medio de montaje DPX

Anexo 8: Protocolo inmunohistoquímica

1) Desparafinación:

- Xilol I (10 min)
- Xilol II (10 min)
- Xilol III (10 min)

2) Rehidratación:

- Alcohol 100% I (5 min)
- Alcohol 100% II (5 min)
- Alcohol 95% (5 min)
- Alcohol 70% (5 min)

3) Lavado en agua destilada durante 10 min.

4) 3 cambios en PBS, 5 min cada uno.

5) Recuperación antigénica en vaporera con buffer citrato, durante 20 min

6) Enfriamiento de las muestras durante 20 min

7) Bloqueo de peroxidasa endógena con H₂O₂ (30%) al 3% en PBS. a temperatura ambiente, durante 15 min.

8) 3 cambios en PBS, 5 min cada uno.

9) Bloqueo de sitios inespecíficos:

- Aplicar Cas – block durante 30 min a temperatura ambiente.
- Incubación con suero de cabra 5% - Tritón X100 0,1% - BSA 4% en PBS 1X, durante 30 min a temperatura ambiente.

10) Incubación del anticuerpo primario:

- Anticuerpo en suero de cabra 5% - Tritón X100 0,1% - BSA 4% en PBS 1X durante la noche a 4° C.

11) 3 cambios en PBS, 5 min cada uno.

12) Incubación del anticuerpo secundario:

- Anti-IgG de conejo, hecho en cabra, conjugado con HRP, diluido 1:250 en suero de cabra 5% - Tritón X100 0,1% - BSA 4% en PBS 1X, durante 1 hora a temperatura ambiente.

13) 3 cambios en PBS, 5 min cada uno.

14) Revelado cromogénico con DAB, durante 5 min, y agregar 1,25 μL de H_2O_2 por cada mL de DAB al momento de usar.

15) Lavar en agua destilada durante 5 min.

16) Contraste nuclear:

- Teñir brevemente con hematoxilina.
- Virar hematoxilina en agua corriente durante 8 min.

17) Deshidratación:

- Alcohol 95% (5 min)
- Alcohol 100% I (5 min)
- Alcohol 100% II (5 min)
- Alcohol/Xilol (5 min)

18) Aclaramiento:

- Xilol I (10 min)
- Xilol II (10 min)

19) Cubrir con medio de montaje DPX

Anexo 9: Protocolo Inmunofluorescencia

- 1) Desparafinación:
 - Xilol I (10 min)
 - Xilol II (10 min)
 - Xilol III (10 min)
- 2) Rehidratación:
 - Alcohol 100% I (5 min)
 - Alcohol 100% II (5 min)
 - Alcohol 95% (5 min)
 - Alcohol 70% (5 min)
- 3) Lavado en agua destilada durante 10 min.
- 4) 3 cambios en PBS, 5 min cada uno.
- 5) Recuperación antigénica con buffer citrato, durante 20 min
- 6) Enfriamiento de las muestras durante 20 min
- 7) Bloqueo de sitios inespecíficos:
 - Aplicar Cas – block durante 30 min a temperatura ambiente.
 - Incubación con suero de cabra 5% - Tritón X100 0,1% - BSA 4% en PBS 1X, durante 30 min a temperatura ambiente.
- 8) Incubación del anticuerpo primario: Anticuerpo en suero de cabra 5% - Tritón X100 0,1% - BSA 4% en PBS 1X durante la noche a 4° C.
- 9) 3 cambios en PBS, 5 min cada uno
- 10) Incubación del anticuerpo secundario (En oscuridad a partir de este paso)
 - Cy2 [verde] y Cy3 [rojo], diluido 1:500 en suero de cabra 5% - Tritón X100 0,1% - BSA 4% en PBS 1X, durante 2 hora a temperatura ambiente
- 11) 3 cambios en PBS, 5 min cada uno
- 12) Contraste nuclear con DAPI, diluido 1:1000 en PBS 1X, durante 10 min
- 13) 3 cambios en PBS, 5 min cada uno
- 14) Lavar en agua destilada durante 5 min
- 15) Cubrir con AQUATEX