

UCH-FC
MAG-B
M 269
C. 1

**ESTUDIOS SOBRE EL MODELO DE LA
NEUROIMUNOMODULACION EN LA PATOGENESIS DE LOS
PROCESOS NEURODEGENERATIVOS**

Tesis

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

Marcela Viviana Mancilla Pérez

Enero, 2016

Director de Tesis Dr: Ricardo Maccioni B



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGÍSTER**

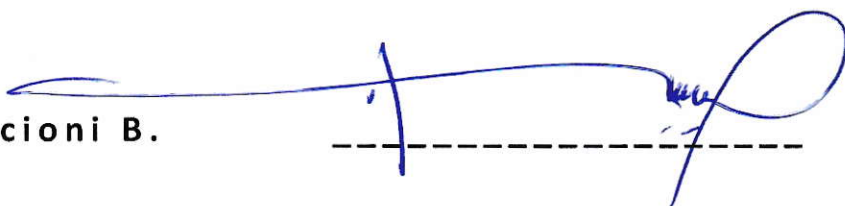
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

MARCELA VIVIANA MANCILLA PEREZ

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 5 de Septiembre de 2013.

Director de Tesis:

Dr. Ricardo Maccioni B.



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Verónica Palma Alvarado



Dr. Julio Alcayaga Urbina



A MIS PADRES...

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Biología Celular, Molecular y Neurociencias, de la facultad de Ciencias de la Universidad de Chile y ha sido financiada por el proyecto FONDECYT 1110373, el proyecto CORFO 14IEAT-28658 y por el Centro Internacional de Biomedicina ICC.

Quiero agradecer a mi Director de tesis, Dr. Ricardo Maccioni B., quien me abrió las puertas de su laboratorio y materializó mis anhelos de hacer ciencia realizando esta tesis; la autonomía que me dio para forjarme como investigadora y la posibilidad de vincularme a la Universidad de Chile, sueño que he cumplido felizmente.

Agradecer a José Jiménez, con quien formé una gran amistad y quien fue un apoyo enorme emocional y laboralmente; a nuestras discusiones científicas y de la vida y al permanente respaldo que me otorgó mientras estuvo en el laboratorio.

Agradecer a Leonardo Guzmán, que me ha apoyado a lo largo de este trabajo y en quien hallé un gran amigo; su apoyo frente a las dificultades personales que se presentaron durante la elaboración de esta tesis y su permanente disposición para concretar este proyecto.

A los miembros estables del laboratorio Inelia Morales y aquellos que ya no están; Carlos Carrasco y Andreas Tapia por su ayuda siempre que la necesité y por ser un gran equipo humano que alienta a sus miembros a ser un equipo de trabajo.

Agradecer a los miembros de la facultad de Ciencias que contribuyeron al desarrollo de esta tesis, la Sra. Margarita, "Carlitos" quien con su cariño y alegría hacía gratas las largas horas de experimentación. A Cristina del Laboratorio de Dinámica Celular y Neuronal, por su disposición y voluntad para facilitar equipos y reactivos necesarios en el desarrollo experimental de esta tesis.

Agradecer a los profesores miembros de mi comisión de tesis: Dra. Verónica Palma y el Dr. Julio Alcayaga por sus valiosos aportes en la corrección de esta tesis, materializado en un trabajo con la rigurosidad científica pertinente.

Finalmente agradecer a mis padres a quienes dedico esta tesis y que nunca dejaron de creer en mí, especialmente a mi madre, que en la dificultad no dejó de alentarme a dar lo mejor de mí.

INDICE DE MATERIAS

Dedicatoria	ii
Resumen Autobiográfico	iii
Agradecimientos	iv
Índice de contenidos	v
Índice de figuras	viii
Índice de tablas	ix
Abreviaturas	x
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiv
INTRODUCCIÓN	1
1.1 La Enfermedad de Alzheimer	1
1.2 Estructura, aspectos moleculares y acción fisiológica de la proteína tau	9
1.3 Agregación patológica y neurotoxicidad	12
1.4 Citoquinas pro- y anti- inflamatorias. Modulación de la activación glial: células gliales y neuronas	16
1.5 Hipótesis	20

1.5.1	Objetivos generales	20
1.5.2	Objetivos específicos	21
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	22
2.1	Materiales	22
2.1.1	Biológicos	22
2.1.2	Reactivos para cultivo celular	22
2.1.3	Equipamiento	23
2.2	MÉTODOS	23
2.2.1	Purificación de proteína htau ₄₀ recombinante desde cultivos de <i>E. coli</i> .	23
2.2.1.2	Purificación de proteína htau ₄₀ por cromatografía de afinidad a ión metálico inmovilizado (IMAC).	24
2.2.1.3	Purificación de proteína htau ₄₀ recombinante por SEC-HPLC.	25
2.2.1.4	Agregación de proteína htau ₄₀ recombinante con ácido araquidónico.	27
2.2.2	<u>Cultivo primario microglial a partir de ratas neonatas.</u>	28
2.2.2.1	Inmunofluorescencia de células microgliales.	29
2.2.3	<u>Cultivo primario de neuronas hipocampales a partir de embriones de rata.</u>	30
2.2.3.1	Inmunofluorescencia de neuronas hipocampales.	31
2.2.4	<u>Activación microglial y obtención de “medio condicionado”</u>	32

2.2.4.1 Ensayo de nitritos	33
2.2.4.2 Determinación de citoquinas por ELISA	33
2.2.4.3 Estimulación de neuronas hipocampales con medio Condicionado microglial.	33
2.2.4.2 Análisis morfométrico de neuronas hipocampales.	34
2.2.5 Análisis de datos.	34
3. RESULTADOS	35
3.2 Morfología de microglías en cultivo primario activadas a Concentraciones crecientes de proteína tau humana (htau40).	35
3.2.1 Activación de microglías	38
3.3 Efectos de medios condicionados de microglías sobre morfología en neuronas hipocampales de rata.	41
4. DISCUSIÓN	46
5. CONCLUSIONES	55
6. BIBLIOGRAFÍA	57



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la “Hipótesis Neuroinmunológica” de la EA.	4
Figura 2. Esquema sobre el papel de tau patológica dentro de nuestra “Hipótesis Neuroinmunológica” de la EA.	5
Figura 3. Isoformas de la proteína tau	10
Figura 4. Purificación de proteína recombinante tau humana (htau40) vista por electroforesis SDS-PAGE.	27
Figura 5. Microfotografía electrónica mostrando polímeros de proteína tau recombinante (htau40)	28
Figura 6. Inmunofluorescencia de células microgliales en cultivo primario de rata.	36
Figura 7. Medición de nitritos en medio condicionado microglial.	39
Figura 8. Producción de mediadores inflamatorios microgliales.	40
Figura 9. Neuronas hipocampales expuestas a medio condicionado microglial.	42
Figura 10. Número y longitud promedio de neuritas en neuronas Hipocampales de rata	45

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Pesos moleculares de isoformas de proteína tau.	11
Tabla 2. Sitios de fosforilación fisiológicos y patológicos de la proteína tau.	14
Tabla 3. Mediciones morfométricas de número y longitud de neuritas en neuronas hipocampales de rata	44

ABREVIATURAS

BSA	Seroalbúmina de bovino
CaMPK II	Proteína quinasa dependiente de Ca^{++} /calmodulina
Cdk-5	Quinasa dependiente de ciclina 5
Cdc2	Quinasa dependiente de ciclina 2
CKII	Caseína quinasa 2
DTT	Ditiotreitol
EA	Enfermedad de Alzheimer
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo Inmuno-absorbente unida a enzima
FBS	Suero bovino fetal
GABA	Acido γ -aminobutírico
Gsk-3 β	Glicógeno Sintasa quinasa 3-beta
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico
HMGB1	Proteína del Grupo de Alta Movilidad Box1
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
hTAU	Tau humana
iNOS	Óxido nítrico Sintasa inducible
IMAC	Cromatografía de afinidad a ión metálico inmovilizado
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

LB	Medio Luria-Bertoni
LPS	Lipopolisacáridos
MAP	Proteína Asociada a Microtúbulos
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MARK	Quinasa reguladora de afinidad a microtúbulos
MBD	Dominio de unión a microtúbulos
NFTs	Ovillos Neurofibrilares
NMDA	N-metil D-aspartato
NO	Óxido nítrico
PBS	Tampón Fosfato Salino
PHFs	Filamentos Helicoidales Pareados
PKA	Proteína quinasa dependiente de AMP cíclico
RAGE	Receptores de productos finales avanzados de la glicación
SAPK	Proteína quinasa activada por estrés
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
SEC-HPLC	Cromatografía de Exclusión Molecular acoplada a HPLC
SNC	Sistema Nervioso Central
STAT	Proteína activadora de transcripción y transductora de señal
TLR	Receptor Tipo Toll

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer es hoy la principal causa de demencia a nivel mundial, llegando a ser considerada no sólo un problema médico sino una crisis del sistema de salud pública debido a su elevada prevalencia, creciente incidencia y el alto costo económico que supone esta patología. En los últimos años se han aportado argumentos científicos en favor que la inflamación juega un rol muy importante en la fisiopatología de esta enfermedad. Sobre el carácter patológico que involucra el eje microglía-neurona, nuestro laboratorio ha postulado como hipótesis que la exposición de las células cerebrales a una serie de **señales de daño**, activan la respuesta inmune innata en el sistema nervioso central (CNS), activando las células microgliales. Este conjunto de señales lleva de manera concertada a una cascada inflamatoria que conduce a la neurodegeneración. Entre estas señales de daño que inducen la patología podemos mencionar: i) estrés oxidativo, ii) sobrecarga de hierro, iii) oligómeros de la proteína β -amiloide, iv) lipoproteínas del tipo LDL circulantes, v) deficiencia de vitamina B6 y B12, entre otras. Estas gatillan la expresión de factores de transcripción, con sobreproducción de citoquinas pro-inflamatorias ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e IL-6), las que inducen patrones alterados de señalización en las células neuronales. Estas alteraciones

incluyen la activación de las proteínas quinasas cdk5, gsk3 β , ERK1/2 lo que conduce a una hiperfosforilación de la proteína tau.

Recientemente, el laboratorio donde se desarrolló esta tesis, ha descrito que oligómeros patológicos y filamentos de tau activan una respuesta inflamatoria seguida de la cascada neurodegenerativa. Una vez que los oligómeros y/o filamentos de tau son liberados al medio extracelular tras la muerte neuronal, estos son capaces de promover la activación microglial a través de un mecanismo de “feedback positivo” sostenido en el tiempo.

Los objetivos específicos de este trabajo de tesis son evaluar los efectos de esta activación microglial sobre la morfología del citoesqueleto neuronal. Para ello se realizaron experimentos de: (1) activación selectiva de células microgliales en cultivo mediante incubación con proteína Tau recombinante; (2) estudio de los efectos de los medios condicionados por la microglía sobre neuronas en cultivo; (3) producción de citoquinas pro-inflamatorias y estudios morfológicos de las neuronas afectadas por la activación microglial. Los resultados mostraron que oligómeros y/o filamentos de tau producían una activación de la microglía, con alteraciones morfológicas de su citoesqueleto y alteraciones bioquímicas, principalmente sobreproducción de nitritos y mediadores proinflamatorios. Además, la exposición de neuronas hipocampales al medio condicionado microglial afectó su morfología acortando sus procesos neuríticos. Estos estudios aportan nuevos antecedentes hacia la comprensión del proceso neurodegenerativo involucrado en patologías como la enfermedad de Alzheimer.

ABSTRACT

Alzheimer's disease is now the leading cause of dementia worldwide, becoming considered not only a medical problem but a crisis of public health system due to its high prevalence, increasing incidence and the high economic costs of this disease. In recent years, scientists have made arguments that inflammation plays an important role in the pathophysiology of this disease. On the pathological character involving the microglia-neuron axis, our laboratory has been postulated as hypothesis that exposure of the brain to a number of signs of damage cells, activate the innate immune response in the central nervous system (CNS), activating the cells microglia. This set of signals in concert leads to an inflammatory cascade leading to neurodegeneration. These signs of damage inducing pathology we can mention: i) oxidative stress, ii) iron overload, iii) oligomers of β -amyloid protein, iv) lipoprotein LDL type circulating iv) deficiency of vitamin B6 and B12, among others. These trigger the expression of transcription factors, with the overproduction of pro-inflammatory cytokines (TNF, IL-1 β and IL-6), altered patterns that induce signaling in neuronal cells. These alterations include the activation of protein kinase cdk5, GSK3, ERK1 / 2 which leads to hyperphosphorylation of tau protein.

Recently, the laboratory where this thesis was developed, has reported that pathological tau oligomers and filaments trigger an inflammatory response followed by the neurodegenerative cascade. Once the oligomers and/or tau filaments are released into the extracellular medium after neuronal death, these are able to promote microglial activation through a mechanism of "positive feedback" sustained over time.

The specific objectives of this thesis are to evaluate the effects of this microglial activation on the morphology of the neuronal cytoskeleton. For these experiments they were performed: (1) selective activation of microglial cells in culture by incubation with recombinant Tau protein aggregate; (2) study of the effects of media conditioned by microglia on neurons in culture; (3) production of pro-inflammatory cytokines and morphological studies of the neurons affected by microglial activation. The results showed that oligomers and/or tau filaments produced microglia activation, with morphological changes of the cytoskeleton and biochemical alterations, mainly overproduction of nitrites and proinflammatory mediators. Furthermore, exposure of hippocampal neurons to the conditioned media microglial morphology affected shortening their neuritic processes. These studies provide new information towards understanding the processes involved in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease.



INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es el tipo más común de demencia que afecta generalmente a personas mayores de 65 años de edad, causando un enorme impacto a nivel emocional, social y económico. Según estimaciones de World Alzheimer Report¹ para el año 2012, al menos 44,8 millones de personas en el mundo padecen esta enfermedad. A su vez, se proyecta un incremento a 65,7 millones para el año 2030 y a 115,4 millones para el 2050. Estadísticas mundiales colocan a Chile, como el tercero dentro de los países de Latinoamérica Sur, con más EA, donde alrededor de un 10% de los adultos sobre 60 años sufrirían este mal¹.

Pese a las drogas aprobadas para atenuar los síntomas, el combatir las causas iniciales de esta ha resultado infructuoso. Existen más de 300 compuestos en estudio y hasta ahora ninguno de ellos ha entregado resultados positivos hacia su tratamiento. Es posible que los blancos a los cuales se han dirigido estas drogas no hayan sido los

¹ http://www.alz.org/documents/national/world_alzheimer_report_2010.pdf

correctos, o que algunos investigadores y la industria farmacéutica han insistido en generar potenciales drogas sin el sustento de una hipótesis plausible para controlar esta patología. Sin embargo, sobre la base de nuestro modelo de neuroinmunomodulación (Fernandez et al., 2008, Maccioni et al., 2009) y las sólidas evidencias clínicas (McGeer et al., 2006), existen blancos prometedores derivados de la neuroinflamación ocurrida en el sistema nervioso central (SNC), enfocándose en aquellos que competen a la comunicación cruzada entre microglía y neuronas (Fernandez et al., 2008, Farias et al., 2011, Morales et al., 2010, Maccioni, 2011).

La EA se caracteriza histopatológicamente por: i) acumulación de agregados proteicos que toman la forma de depósitos extracelulares también denominados placas seniles de un péptido de 39 a 42 aminoácidos llamado β -amiloide ($A\beta$), que se origina a partir de la llamada proteína precursora del amiloide (APP, del inglés Amyloid Precursor Protein) y ii) depósitos intracelulares de ovillos neurofibrilares (NFTs, del inglés Neurofibrillary Tangles) compuestos de proteína tau alterada (en adelante solo tau). La proteína alterada tiene un alto nivel de hiperfosforilación y se ensambla en agregados patológicos, entre ellos oligómeros y filamentos helicoidales pareados (PHFs, del inglés Paired helical filaments) provocando pérdida de función sináptica y muerte neuronal (Dubois et al., 2007, Morris et al., 2011). Este proceso de neurodegeneración culmina cuando los agregados son liberados al medio extracelular, existiendo evidencia que apoyan su neurotoxicidad (Farias et al., 2011).

La evidencia existente apunta al hecho que la deposición de proteína tau puede estar involucrada en la degeneración neuronal, ya que estudios en cultivos celulares muestran que la sobreexpresión de tau altera la morfología celular, retrasa el crecimiento celular y cambia la distribución de organelos que son transportados a través del eje axonal por proteínas motoras asociadas a microtúbulos (Maccioni & Cambiasso, 1995). Más aún, en ratones transgénicos que sobreexpresan la isoforma de tau humana de cuatro secuencias repetidas, se desarrolla degeneración axonal en neuronas del cerebro y de ganglios de la raíz dorsal, producto de la acumulación de los neurofilamentos (Spittaels et al., 1999).

Se han formulado múltiples hipótesis que buscan unificar los distintos factores involucrados en la patogénesis de la EA, entre los que destacan: estrés oxidativo, sobrecarga de hierro, alta ingesta de lípidos, deficiencia de vitamina B6 y B12, infecciones al SNC, traumas cerebrales entre otras. Estos factores anteceden a la degeneración neuronal y por sí solas no son causa de la enfermedad (Maccioni & Perry, 2009). Una explicación plausible basada en observaciones de nuestro laboratorio, sugiere que la hiperfosforilación y la consecuente autoagregación de tau por los sistemas de proteínas quinasa constituirían un producto final común que sería el resultado de diferentes mecanismos de señalización alterados en las neuronas en proceso de degeneración. Al mismo tiempo nuestra hipótesis de la neuroinmunomodulación (Maccioni et al., 2009, Maccioni et al., 2010) plantea la pregunta sobre qué gatilla la hiperfosforilación de tau y su posterior

autopolimerización, y la pregunta sobre como tal mecanismo de activación de células microgliales puede ser gatillado por factores de riesgo tan diversos (Figura 1).

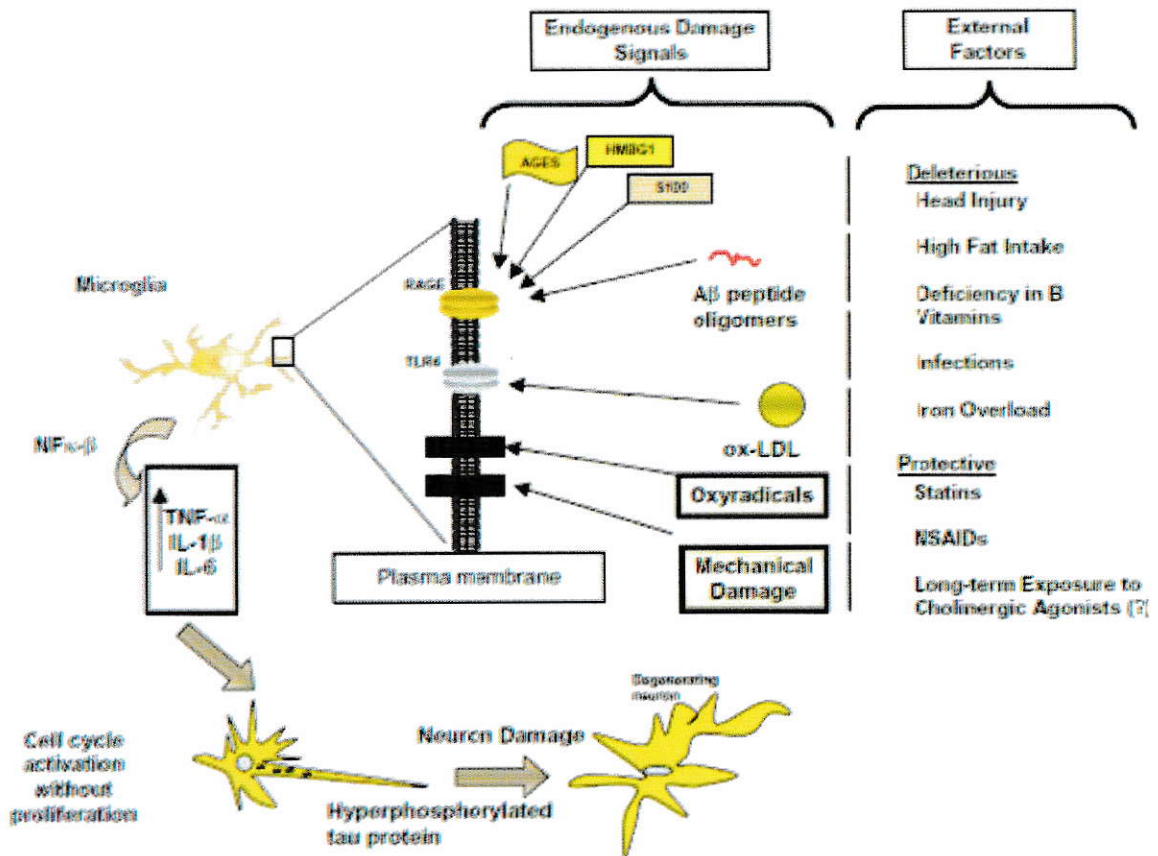


Figura 1. Esquema de la “Hipótesis Neuroinmunológica” de la EA (Fernandez et al., 2008).

Después del planteamiento de esta hipótesis hacia el año 2005, investigaciones posteriores en el laboratorio han apuntado hacia el papel de oligómeros de tau como agentes inductores de la activación de la microglía, seguida por la cascada neurodegenerativa, como se aprecia en el mecanismo “feedback” propuesto y que es la base de esta Tesis de Magister (Figura 2) (Morales et al., 2010).

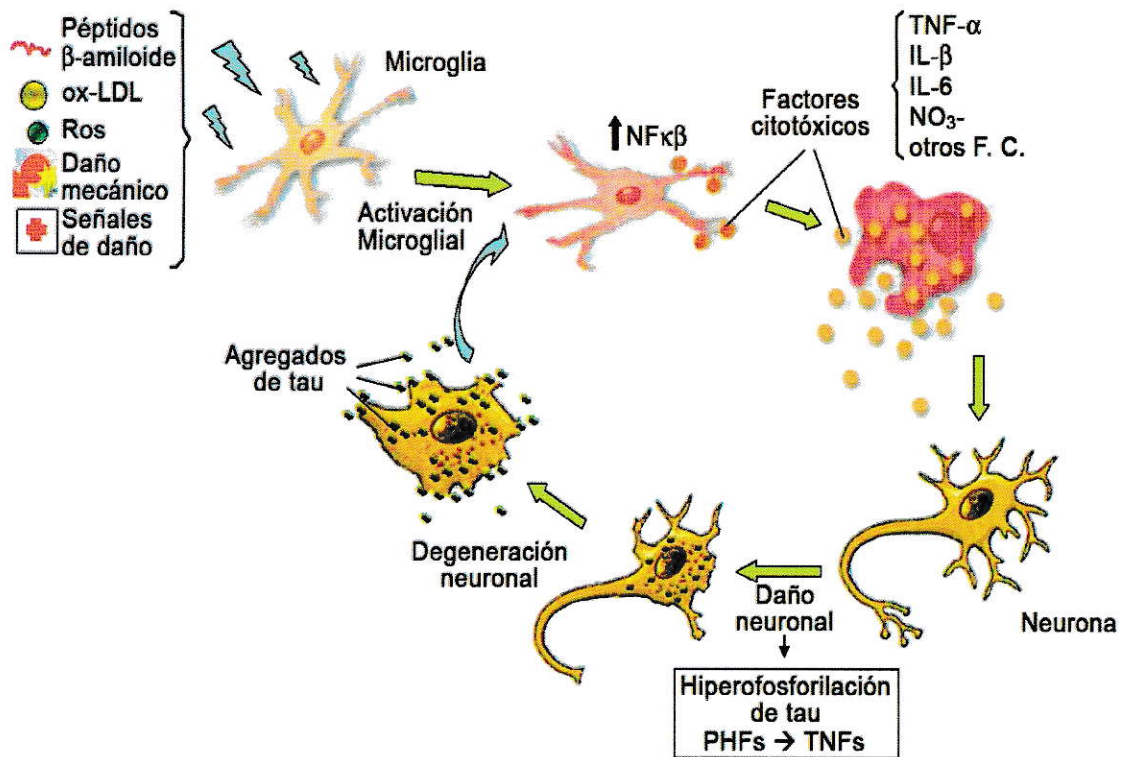


Figura 2. Esquema sobre el papel de tau patológica dentro de nuestra “Hipótesis Neuroinmunológica” de la EA (adaptado de Fernández *et al.*, 2008 y Morales *et al.*, 2010).

Otras evidencias que sustentan esta hipótesis se apoyan en observaciones realizadas en pacientes de edad avanzada con EA, los cuales presentan una disminuida actividad fagocítica de las microglías y en estudios realizados en pacientes tratados con anti-inflamatorios durante períodos prolongados, en los que disminuía notablemente la incidencia de la EA (McGeer *et al.*, 2006). Este rol protagónico de la inflamación ha llevado a clasificar a la EA como un desorden del sistema inmunológico innato (Maccioni *et al.*, 2009).

La actividad de las microglías incluye fagocitosis y muerte de patógenos, constituyendo la primera línea de defensa contra agentes nocivos en el cerebro, escaneando el entorno circundante y detectando cambios en la homeostasis extracelular, que pueden significar daño para las neuronas (Kettenmann et al., 2011). En un estado sobre-activado estas respuestas resultan tóxicas ya que producen especies reactivas de oxígeno, proteínas del complemento, citoquinas pro-inflamatorias, entre otros productos (Orellana et al., 2007). A su vez, las neuronas también responden frente a las señales emanadas de la microglía (Kettenmann et al., 2011). Un ejemplo de esto es la liberación de múltiples neurotransmisores que incluyen GABA (ácido gamma-aminobutírico), dopamina, acetilcolina y serotonina tanto en cultivo celular como en preparaciones de tejido, expuestos a citoquinas pro-inflamatorias (Hanisch, 2002), como el aumento de calcio intracelular [Ca^{+2}], inducido por receptores NMDA (N-metil D-aspartato) que interactúan directamente con IL-1 β , incrementando su excitabilidad (Gardoni et al., 2011).

Las citoquinas pro-inflamatorias (TNF α , IL-1 β e IL-6) señalizan a través de receptores en variados tipos celulares incluyendo los neuronales, activando en estas últimas varias proteínas quinasas involucradas en la hiperfosforilación de tau, induciendo así cambios conformacionales en esta e iniciando el proceso de autoagregación hacia oligómeros como agentes tóxicos. Estudios realizados por nuestro laboratorio (Morales et al., 2010, Morales et al., 2013) muestran que microglías activadas, provenientes de cultivos celulares primarios de ratas, secretan citoquinas pro-inflamatorias capaces de inducir

neurodegeneración y fosforilación de tau en neuronas hipocampales de ratas embrionarias (Morales et al., 2010).

La IL-6 es una citoquina pro-inflamatoria secretada tanto por microglías como por astrocitos activados, induce la hiperfosforilación de tau tipo Alzheimer (Quintanilla et al., 2004). Por su parte, la IL-1 β también juega un rol central en modular y propagar respuestas inflamatorias en el cerebro (Kitazawa et al., 2011).

Algunos receptores microgliales para señales de daño como TLR4 (receptores tipo "Toll" 4) activan las células gliales, afectando así a neuronas sometidas a esta activación. Este receptor se conoce por reconocer lipopolisacáridos (LPS) y responder a señales de daño endógenas. Datos experimentales han indicado que la señalización de TLR4 se activa bajo señales de daño como A β , dando nuevas luces respecto al mecanismo de acción (Covacu et al., 2009).

Siendo la oligomerización de tau clave en EA, un descubrimiento relevante que apoya esta hipótesis, es que las microglías bajo activación gatillan la oligomerización de tau y la formación de filamentos (Yoshiyama et al., 2007).

Patologías como EA y otros desordenes neurodegenerativos parecieran surgir cuando las señales de daño que inducen la activación de la microglía, son sostenidas en el tiempo (Hirsch & Hunot, 2009, Maccioni et al., 2009), causando una sobreactivación de las microglías y un aumento en la secreción de citoquinas y moléculas citotóxicas que dañan el tejido cerebral (Quintanilla et al., 2004, Rojo et al., 2008). Se han descrito una

serie de señales de daño que activan la microglía como son la sobrecarga de hierro, productos avanzados de glicación ("*Advanced Glycation End-products*"; AGEs), proteína del grupo B1 de alta movilidad ("*High-mobility group Box1 protein*"; HMGB1), proteína S-100, péptido A β (como oligómero, no como agregado) vía receptores para productos avanzados de glicación ("*Receptor for Advanced Glycan End-products*"; RAGE). Además, la lipoproteína de baja densidad (LDL, del inglés *Low Density Lipoprotein*) oxidada activa la microglía mediante receptores TLR, específicamente TLR4 (Fernandez et al., 2008). Todas estas señales gatillan un mecanismo de alarma del sistema inmune innato, que comienza con un incremento en la actividad del factor de transcripción NF κ - β ("*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*"), el cual induce la producción de citoquinas como TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Fernandez et al., 2008, Kovac et al., 2011). La excesiva liberación de estas moléculas genera una respuesta inflamatoria local y muerte neuronal. Aunque TNF- α no se ha asociado a neuroprotección, se ha observado una disminución en la actividad de cdk5 en ciertas condiciones celulares específicas (Arai et al., 1990).

IL-6 induce la hiperfosforilación de tau a través de activación de cdk5, interfiriendo con la regulación del complejo cdk5/p35 e incrementando la concentración intraneuronal de cdk5. IL-6 también activa el sistema JAK/STATs y MAPK-p38 (Quintanilla et al., 2004, Orellana et al., 2005). El rol de IL-6 en neuroinflamación y neurodegeneración se ha asociado a un efecto en el deterioro cognitivo (Rojo et al., 2008). IL-1 β también está involucrada en la activación de cdk5, aumentando la actividad del complejo cdk5/p25 y

activando MAPK-p38, exacerbando la fosforilación de tau (Kitazawa et al., 2011) como también induce la producción de óxido nítrico en neuronas hipocampales, estando estrechamente relacionado a la muerte celular (Serou et al., 1999, Maccioni et al., 2001, Rojo et al., 2008).

Estructura, aspectos moleculares y acción fisiológica de la proteína tau.

Tau es la fosfo-proteína asociada a microtúbulos (MAP) más importante encontrada en el SNC y sistema nervioso periférico. En el cerebro, tau se encuentra predominantemente en los cuerpos celulares y preferencialmente en axones de neuronas, estando involucrada en la estabilización y el ensamblaje de microtúbulos, contribuyendo a establecer la polaridad neuronal, extensión axonal y transporte (Ballatore et al., 2007).

En el ser humano, el gen de la proteína tau está localizado en el cromosoma 17q21, extendiéndose sobre 100Kb y el transcrito primario contiene al menos 16 exones. Tau puede ser subdividida en cuatro regiones: una región de proyección N-terminal, un dominio rico en prolinas, un dominio de unión a microtúbulos (MBD), y una región C-terminal. Del corte y empalme (splicing) alternativo alrededor de la región N-terminal y MBD, se generan seis principales isoformas en el cerebro humano adulto, comprendidas en un intervalo de peso molecular aparente de 55 a 70KDa (Buee et al., 2000) (Figura 3). La nomenclatura de las isoformas de tau está basada en el número de

secuencias repetidas de unión a microtúbulos (llamadas “R”) y la presencia o ausencia por splicing de exones en el N-terminal, (llamados “N”). De esta manera tenemos tau 3R con tres secuencias repetidas de unión a microtúbulos, tau 4R con 4 repeticiones debido a la inclusión del exón 10, 0N que no incluye exones en el N-terminal, 1N que incluye al exón 2 y 2N que incluye a los exones 2 y 3 (Mandelkow & Mandelkow, 2012) (Tabla 1).

En el cerebro humano el equilibrio entre fosforilación y desfosforilación origina cambios estructurales y conformacionales en tau, lo que regula la estabilidad del citoesqueleto y consecuentemente la morfología axonal.

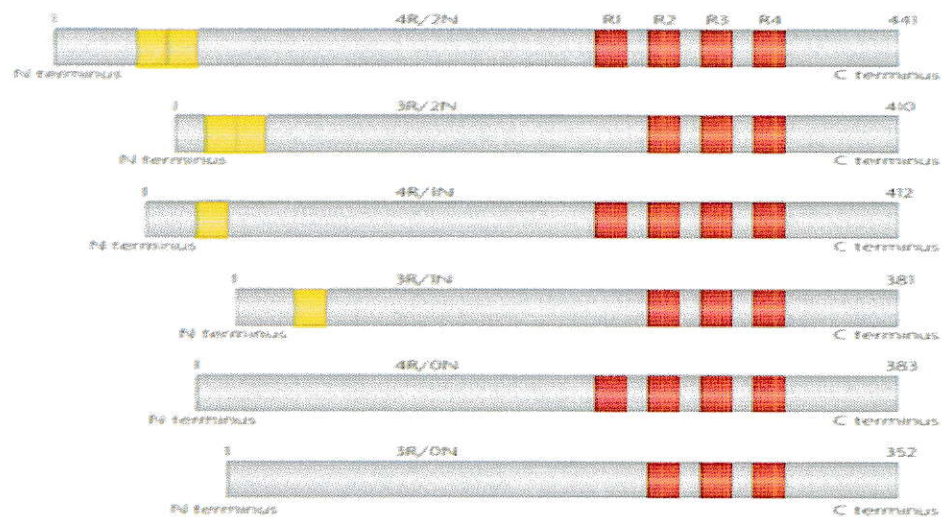


Figura 3. Isoformas de la proteína tau (Ballatore et al., 2007, Mandelkow & Mandelkow, 2012).



Tabla 1. Pesos moleculares de isoformas de proteína tau

Clon	Insertos/ repeticiones	Cantidad de aminoácidos	Peso molecular (KDa)
Htau40	2N4R	441	45,9
Htau39	2N3R	410	42,6
Htau34	1N4R	412	43,0
Htau37	1N3R	381	39,7
Htau24	0N4R	383	40,0
Htau23	0N3R	352	36,7

Fuente: Mandelkow & Mandelkow, 2012.

Fisiológicamente tau posee una estructura nativa no plegada y de carácter hidrofílico. Su cadena polipeptídica es altamente flexible y móvil, teniendo un bajo contenido de estructuras secundarias (α hélice, sábanas β plegada, hélices poli-prolina tipo II), lo que podría explicar la multiplicidad de interacciones con proteínas citoesqueléticas, quinasas y fosfatasa, proteínas motoras, chaperonas, dominios SH3 de otras proteínas, proteínas de la membrana celular, ácidos grasos, entre otros, pudiendo tau funcionar como una proteína de andamio, modulando las vías de señalización, entre otros importantes roles (Mandelkow & Mandelkow, 2012).

Agregación patológica y neurotoxicidad.

El mecanismo de agregación de la proteína tau, aún es materia de investigación, pero variados estudios permiten establecer varios eventos patogénicos que pueden contribuir directa o indirectamente en la fosforilación, mal plegamiento, agregación y que preceden a la neurodegeneración (Farias et al., 2011).

Durante el desarrollo de la EA, tau comienza a fosforilarse en múltiples sitios (Tabla 2) y se integra dentro de los filamentos helicoidales pareados (PHFs), dando lugar a los NFTs, perdiendo sus funciones biológicas. En condiciones patológicas el equilibrio de unión de la proteína tau a los microtúbulos se ve perturbado, aumentando la fracción de tau no unida en el medio citosólico, adquiriendo así cambios conformacionales patológicos que conllevan a la oligomerización y formación de fibrillas característica de la enfermedad. El desequilibrio de esta unión ocurre por acción de diferentes quinasas y fosfatasas. Las principales quinasas involucradas en las modificaciones de tau y neurodegeneración han sido divididas en dos grupos: proteínas quinasas dirigidas a prolina o motivos prolina-serina/treonina (P-ST), como son la proteína quinasa activadora de mitógenos ("*mitogen activate protein kinase*"; MAPK), quinasa 3b de la glicógeno sintetasa ("*glycogen synthase kinase b*"; GSK3b), quinasa tau-tubulina ("*tau tubulin kinase*"), quinasa dependiente de ciclina ("*cyclin dependent kinase*"; cdc2 y cdk5), quinasas activadas por estrés ("*stress-activated protein kinases*"; SAPK) y quinasas que fosforilan motivos distintos a P-ST, las cuales incluyen quinasa reguladora de afinidad a microtubulos ("*microtubule-affinity regulating kinase*"; MARK), proteína

quinasa II dependiente de Ca^{2+} /calmodulina ("*Ca²⁺/ calmodulin-dependent protein kinase II*"; CaMPK II), proteína quinasa dependiente de AMP cíclico ("*cAMP-dependent Protein kinase*"; PKA) y quinasa II de la caseína ("*casein kinase II*"; CKII) (Buee et al., 2000).

Tabla 2. Sitios de fosforilación fisiológicos y patológicos de la proteína tau (García *et al.*, 2002).

Sitio	Cinasas	Notas
S64P ^a	ERK2, p38	Identificado sólo por anticuerpo en PHF
T175P ^a	ERK2, JNK, p38, GSK3 β	Identificado en PHF
T181P ^a	TPKII, ERK2, JNK, p38, GSK3	Identificado en PHF e isoforma letal
S185 ^a	p38	Identificado en PHF
S199P ^a	TPKI, GSK3 β	Identificado en PHF e isoforma letal
S202P ^a	TPKII, ERK2, JNK, p38	Identificado en PHF e isoforma letal
T205P ^a	TPKII, ERK2, JNK, p38	Identificado con anticuerpos en PHF
T212P ^a	TPKII, ERK2, JNK, p38	Identificado en PHF
S214 ^a	Cinasa p110, PKA	Afecta la interacción con microtúbulos. PKA, fosforila sólo la isoforma que contiene 3 de las 4 secuencias repetidas. Sitio implicado en los primeros pasos de la conversión de tau normal a tau en la EA.
T217P ^a	TPKII, ERK2, p38, GSK3 β	Identificado en PHF e isoforma letal
T231P ^a	ERK2, JNK, p38, GSK3 β	Característica específica de PHF-tau y marcador bioquímico para diagnóstico de EA. La fosforilación de este sitio provoca máxima inhibición de unión a microtúbulos porque se localiza en el primer dominio de unión a éstos. Identificado en PHF e isoforma letal.
S235P ^a	ERK2, JNK, p38, GSK3 β	Característica específica de PHF-tau y marcador bioquímico para diagnóstico de EA. Identificado en PHF e isoforma letal
T245 ^a	p38	
S262	Cinasa p110, proteína cinasa II dependiente de Ca ²⁺ /calmodulina, (CaMPKII), (MAP)	Afecta la interacción con microtúbulos. Sitio localizado en la región RI.
S285		Localizada entre las regiones RI y R2
S305	p38	Localizada entre las regiones R2 y R3
S324		Situado en la región R3
S352		Situado en la región R4
S356	JNK, p38	Identificado en PHF
S396Pro ^a	TPKII, ERK2, JNK, p38, GSK3 β	Sito crítico para el ensamblaje de microtúbulos. Identificado en PHF e isoforma letal.
S400 ^a	GSK3 β	Identificado en PHF e isoforma letal.
S404P ^a	TPKII, ERK2, p38, GSK3 β	Sito crítico para el ensamblaje de microtúbulos. Identificado en PHF e isoforma letal.
S409	PKA	Sitio implicado en los primeros pasos de la conversión de tau normal a tau en la EA.
S413	GSK3 β	

Evidencias previas indican que el complejo cdk5/p35 participa en el crecimiento axonal normal y en la extensión de procesos neuríticos en neuronas (Alvarez et al., 1999a, Alvarez et al., 2001). Además participa en la migración y diferenciación neuronal durante el desarrollo del sistema nervioso (Nikolic et al., 1996). Estos hallazgos indican que cdk5 es una proteína multifuncional que asociada a otras proteínas celulares interactúa con el citoesqueleto y forma complejos supramoleculares. Cdk5 contribuye a la fosforilación de tau humana en los residuos S202, T205, S235 y S404. De manera concomitante en la ruta degenerativa la fosforilación anómala inicial de tau por cdk5 estimula modificaciones en GSK3b (Alvarez et al., 1999a, Alvarez et al., 1999b).

GSK3b es una de las principales quinasas involucradas en la fosforilación aberrante de tau y parece estar implicada en la patología de EA. Esta quinasa interactúa con presenilina PS1, sugiriendo que forma parte del complejo regulador de la fosforilación de tau. La fosforilación de los residuos S214 y S409 por PKA sobre la isoforma que contiene 3 de las 4 secuencias repetidas, es de particular interés ya que está implicada en las primeras etapas de la conversión de tau normal a tau agregada en EA (Ihara et al., 1986). El residuo aminoacídico S214 se encuentra dentro de la región N-terminal rica en prolina (dominio de unión a microtúbulos), este sitio juega un papel crucial en la dinámica de los microtúbulos, mitosis e interacción con otras MAPs. Durante el desarrollo neuronal el residuo S214 se encuentra principalmente en su forma fosforilada. Una vez que las neuronas se han diferenciado, los niveles de fosforilación

decrecen y permanecen así hasta que factores desconocidos perturban el sistema y se fosforila nuevamente causando la enfermedad (Ihara et al., 1986).

Hallazgos recientes mostraron que miembros de la familia de proteínas quinasas activadas por estrés (SAPKs), eran capaces de fosforilar a tau *in vitro*, específicamente SAPK1 (c-Jun N-terminal quinasa, JNK), SAPK2a (p38), SAPK2b (p38b), SAPK3 (ERK6) y SAPK4. La activación de SAPKs ocurre en respuesta a múltiples formas de estrés celular (choque osmótico e inhibición de síntesis de proteínas) y por ciertas citoquinas pro-inflamatorias (interleuquina 1 y factor α de necrosis tumoral). SAPKs fosforilan residuos serina y/o treonina, precedidos por prolina (Jenkins et al., 2000).

Citoquinas pro- y anti- inflamatorias. Modulación de la activación glial: células gliales y neuronas.

Glías y neuronas expresan constitutivamente citoquinas, que modulan variadas funciones, incluyendo la homeostasis y metabolismo celular, la función y plasticidad sináptica, y la transmisión neural. En respuesta a injuria, infección o diversas condiciones de estímulo, glías y neuronas producen más quimioquinas, citoquinas como TNF- α , IL-1, IL-6, IFN- γ , IL-10 y TGF β - y prostaglandinas (Von Bernhardi, 2007).

Además de amplificar la respuesta inflamatoria, las citoquinas también inducen la liberación de factores neuroprotectores. Por ejemplo, IL-1 β es un pro-inflamatorio que

induce la expresión de iNOS y la producción de NO mediado por la activación de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) y NFκB, puede tanto contribuir como limitar la neurotoxicidad (Marcus et al., 2003). Liberada en cantidades pequeñas, promueve la re-mielinización y la supervivencia neuronal.

La IL-1β aumenta en el envejecimiento, asociada al aumento de la reactividad glial. En la EA, su expresión es inducida tempranamente (Akiyama et al., 2000). TNF-α tiene efectos pleiotrópicos en las neuronas, incluyendo efectos tóxicos y protectores y la modulación de la neurotransmisión. Su expresión en el SNC normal es controvertida. Cuando es inducida por daño, el TNF-α tiene un papel clave como mediador de muerte celular, estando implicada en la patogénesis de muchas enfermedades neurológicas (Vitkovic et al., 2000). Sin embargo, también cumpliría un papel protector en modelos de enfermedades desmielinizantes y daño traumático (Arnett et al., 2001).

El IFN-γ es el mediador central en las enfermedades autoinmunes, aunque también previene la muerte celular de neuronas privadas de Factor de Crecimiento Neural (NGF). Además, en combinación con LPS, IFN-γ previene la apoptosis inducida por Aβ en cultivos hipocámpales, efecto que se asocia al aumento de TGF-β1 y depende de la activación de astrocitos (Ramirez et al., 2005). TGF-β1 presenta funciones múltiples, incluyendo papeles prominentes en el desarrollo, homeostasis y reparación. Existen concentraciones bajas de TGF-β1 en el SNC normal, mientras su expresión aumenta

en el envejecimiento, aparentemente secundario a la activación glial, y en múltiples patologías. TGF- β 1 sería una molécula citoprotectora, siendo sintetizada en respuesta a daños como la isquemia y la neurotoxicidad inducida por A β . Su efecto neuroprotector puede ser directo e indirecto, previniendo la sobre-activación microglial. TGF- β 1 modula la producción de NO y radicales superóxido, e inhibe la producción de IL-1, TNF- α e IFN- γ , y la liberación de NO (Lieb et al., 2003).

La IL-6 es una citoquina pleiotrópica que media respuestas inmunes y reacciones inflamatorias que afectan el crecimiento y diferenciación celular del sistema nervioso central. Esta expresada durante el desarrollo y en el adulto a niveles apenas detectables, es fuertemente inducida bajo condiciones patológicas (Vallieres & Rivest, 1997). Microglía, astrogía, neuronas y células endoteliales, todas muestran ser capaces de sintetizar IL-6 (Frei et al., 1989). A nivel molecular muchos péptidos sobreexpresan esta citoquina en el cerebro. Un ejemplo es la fuerte inducción de IL-6 en astrocitos por TNF- α , IL-1 β en conjunto con IL-6 y su receptor (Van Wagoner & Benveniste, 1999).

Aunque la sobreexpresión de IL-6 es generalmente perjudicial y puede agregarse a la patología asociada con varios desordenes del SNC, hay evidencia que IL-6 puede tener propiedades antiinflamatorias, inmunosupresivas, entre otras, bajo niveles de exposición y condiciones restringidas. Por ejemplo se ha sugerido que IL-6 juega un rol en regular la función y supervivencia neuronal (Gadient & Otten, 1997).

En definitiva, la producción de estos mediadores proinflamatorios que conlleven a un estado patológico, como ha sido propuesto en la hipótesis neuroinmunomoduladora, dependerá del perfil de su secreción y de otros factores del microambiente, un aspecto a evaluar en esta tesis.

HIPOTESIS.

Se plantearon las siguientes dos hipótesis que fueron evaluadas con los diferentes enfoques experimentales que se abordan en esta Tesis. Estas son:

1. La proteína tau agregada como señal de daño induce activación bioquímica de células de la microglía en cultivo.
2. La estimulación neuronal con el medio condicionado por las microglías, ejerce un efecto sobre la morfología neuronal así como en el citoesqueleto de neuronas hipocampales de rata.

OBJETIVOS GENERALES

1. Evaluar la acción de tau agregada sobre células de microglía en cultivo.
2. Evaluar el efecto de citoquinas pro-inflamatorias procedentes de microglías activadas por proteína tau agregada sobre neuronas hipocampales.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Estimular cultivos primarios de células microgliales con tau agregada y evaluar su activación mediante producción de nitritos.
2. Evaluar el proceso de activación de las microglías, mediante la medición de los niveles de IL-6 y TNF α presentes en el medio de cultivo microglial previa estimulación con proteína tau agregada.
3. Analizar efectos del medio condicionado de microglías activadas sobre la morfología neuronal y el citoesqueleto en neuronas hipocampales de rata.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Biológicos

Cepa bacteriana *Escherichia coli* BL21 (D3)

Ratas neonatas y preñadas *Sprague dowley* (La manipulación de los animales contó con certificado de bioética para su utilización en cultivos primarios).

Reactivos para cultivo celular

Medio Eagle modificado Dulbecco (DMEM) alto en glucosa (Caisson), mezcla de nutrientes Ham - F12 (Caisson), Suero Fetal Bovino (FBS) (HyClone), solución de Antibiótico / Antimicótico 100X (HyClone), Poli-L-Lisina (SIGMA), lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* serotipo 0111:B4 (SIGMA), tripsina 10X (HyClone), buffer fosfato salino (PBS) 1X (preparado y esterilizado), Solución Salina balanceada de Hank's (HBSS) (preparada y esterilizada), Tripsina 2,5%, Medio Neurobasal (GIBCO), Piruvato de sodio 100mM (GIBCO), L-glutamina 200mM (GIBCO), Glutamax 100X (GIBCO).

Equipamiento

Ultracentrifuga Sorvall Ultra Pro80 (Sorvall), lector de placas Sunrise (TECAN), Procesadora (Hamilton Beach), lupa (BAUSH y LOMB), microscopio óptico de luz clara 10X-20X-40X (Nikon), microscopio confocal (Carl Zeiss) modelo Lampa 510 META, microscopio electrónico de transmisión modelo EM 1200 (Jeol Ltda. Tokio, Japón), agitador orbital (BIOSAN), bomba de Vacío (Gelman Science), horno agitador (HYBRAID), incubadora (Forma Scientific), pHmetro (Lab-Tec), balanza analítica (Arquimed), balanza granataria (SARTORIUS), centrífuga clínica (International equipment CO), campana de flujo laminar (FACTOMET).

MÉTODOS

Purificación de proteína htau₄₀ recombinante desde cultivos de *E. coli*.

La purificación y posterior preparación de filamentos se basó en el protocolo descrito por Barghorn y colaboradores (Barghorn et al., 2005). La secuencia para hTAU₄₀ se encuentra clonada en el vector de expresión pET-3a (NOVOGEN), a la cual se le agregó un tag o cola de histidina.

A partir de un stock de células *E. coli* BL21 (D3) transformadas con el plásmido de expresión pET-3a/hTAU40, se tomó un inóculo y se llevó a cultivo en 50mL de medio LB

con ampicilina (100µg/mL) que se dejó crecer O.N a 37°C en agitación constante (220rpm).

Al día siguiente, de este cultivo, se tomó 20mL y se llevó a 1L de medio LB con kanamicina (100µg/mL), con agitación constante a 220rpm hasta alcanzar una densidad óptica entre 0,5 – 0,6 leído a 600nm por espectrofotometría. Se indujo la expresión de la proteína agregando IPTG 1mM durante 3 horas y posteriormente el cultivo se centrifugó a 7000rpm por 5 minutos. Se repitieron las centrifugaciones, para concentrar las bacterias en tubos de 50mL, se dejó secar lo que quedó del sobrenadante y las muestras se almacenaron a -80°C hasta su posterior procesamiento.

Al día siguiente, los “*pellets*” fueron resuspendidos en 10mL de amortiguador de extracción frío junto con un cóctel de inhibidores de proteasas sin EDTA, para luego ser sonicados en hielo de 8 a 10 pulsos de 30 segundos a máxima potencia. Se centrifugó a 5000rpm por 10 minutos, y el “sobrenadante” quedó listo para ser mezclado con la resina (purificación por IMAC).

Purificación de htau₄₀ recombinante por cromatografía de afinidad a ión metálico

inmovilizado (IMAC)

El siguiente paso es la purificación de hTAU₄₀ dada por la unión de la proteína a una resina de Niquel-sefarosa que presenta afinidad por las colas de histidina. La resina de la columna contenía 3mL de Sefarosa equilibrada con 10mL de volumen de columna de amortiguador de unión.

El sobrenadante del extracto total de proteínas centrifugado, se puso en contacto con la resina en agitación durante 1 hora a 4°C en tubo de 50mL. Se reempacó la columna, se dejó pasar por gravedad un volumen libre de ésta (*flow-through*), y se lavó con 10 volúmenes de amortiguador de lavado a flujo de 1mL/minuto. Enseguida las proteínas unidas a la columna fueron eluidas a igual flujo con 5 volúmenes de columna de amortiguador de elución, recolectándose fracciones de 3mL. Aquellos tubos que contenían proteínas se agruparon y concentraron en tubo Milipore (10KDa), hasta obtener un volumen de 1mL, dializándose contra 1L de buffer SEC-HPLC toda la noche a 4°C con agitación constante.

Purificación de htau₄₀ recombinante por SEC-HPLC.

Como segunda etapa de purificación, se utilizó el sistema de cromatografía de exclusión molecular acoplado a HPLC. Se utilizó una columna Proteema100 5 μ (PSS, Alemania) en sistema HPLC Hitachi. La columna fue equilibrada por 30 minutos con buffer SEC-HPLC a flujo de 0.5mL/minuto antes de ser utilizada y se cargaron 20 μ l de muestra dializada por inyección, eluyéndose con igual flujo con detección automática de absorbancia a 215nm.

Según el cromatograma generado se recuperaron fracciones de hTAU40 con el grado de pureza deseado. El mismo proceso se realizó hasta pasar por la columna todo el volumen de proteína dializada, y todas las fracciones fueron agrupadas y concentradas en tubos Milipore (10KDa) hasta un volumen final de entre 1 y 2mL. Finalmente se

midió la concentración de la proteína tau mediante el coeficiente de extinción molar ($\epsilon = 7700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a 280nm. La muestra fue alicuotada y almacenada a -20°C para su posterior uso.

El protocolo de purificación para la proteína tau recombinante de uso rutinario en el laboratorio, asegura un rendimiento de aproximadamente 10 a 100mg/mL con una pureza mayor al 95% partir de cultivos de *E. coli*. En la **Figura 4**, se obtuvo un rendimiento de 2.45mg/mL para la isoforma más larga de la proteína tau humana (htau40) en un volumen de cultivo de 2L cuando la muestra fue procesada por SEC-HPLC. Para asegurar la eficacia en la separación se corrió un gel SDS-PAGE al 12% identificando con un marcador de peso molecular la presencia de tau40 cuyo peso aparente está entre los 55 y 70 KDa, visualizando una de las 3 fracciones de eluido obtenido de la columna IMAC-Sefarosa y de lo obtenido al pasar esta fracción por SEC-HPLC.

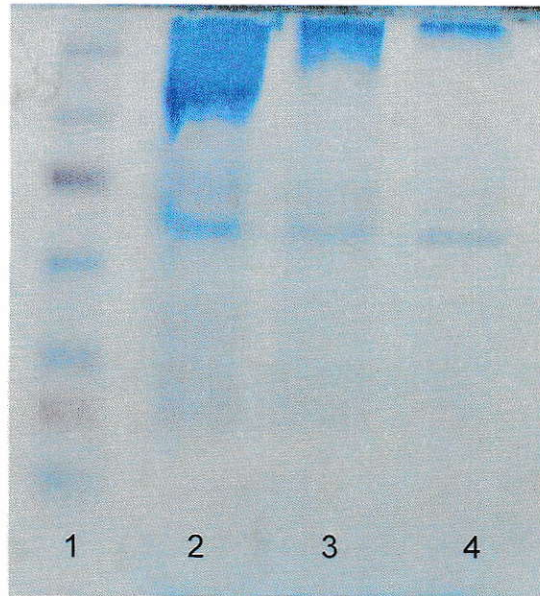


Figura 4. Purificación de proteína tau recombinante humana (htau40) vista por electroforesis (SDS-PAGE) al 12% y visualizado mediante tinción azul de Coomassie. Carril 1, standard de peso molecular (10 a 250 KDa); carril 2 eluido recuperado de columna de exclusión molecular (IMAC); carril 3 y 4 proteína htau40 purificada por SEC-HPLC.

Agregación de proteína htau₄₀ recombinante con ácido araquidónico.

Para estimular la polimerización de la proteína tau se preparó en campana una mezcla que contenía 750µl de proteína tau monomérica a una concentración de 1mg/mL en buffer ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico (HEPES) 1M, 15µl de DTT 5mM, 56,3µl de ácido araquidónico (AA) 2mM disuelto en etanol 100% y 678.7µl de buffer HEPES 1M y se dejó incubando a temperatura ambiente por 12 horas. Posteriormente se almacenó a -20°C para su utilización. En la Figura 5 se muestran los polímeros de tau obtenidos de este procedimiento de autoagregación.

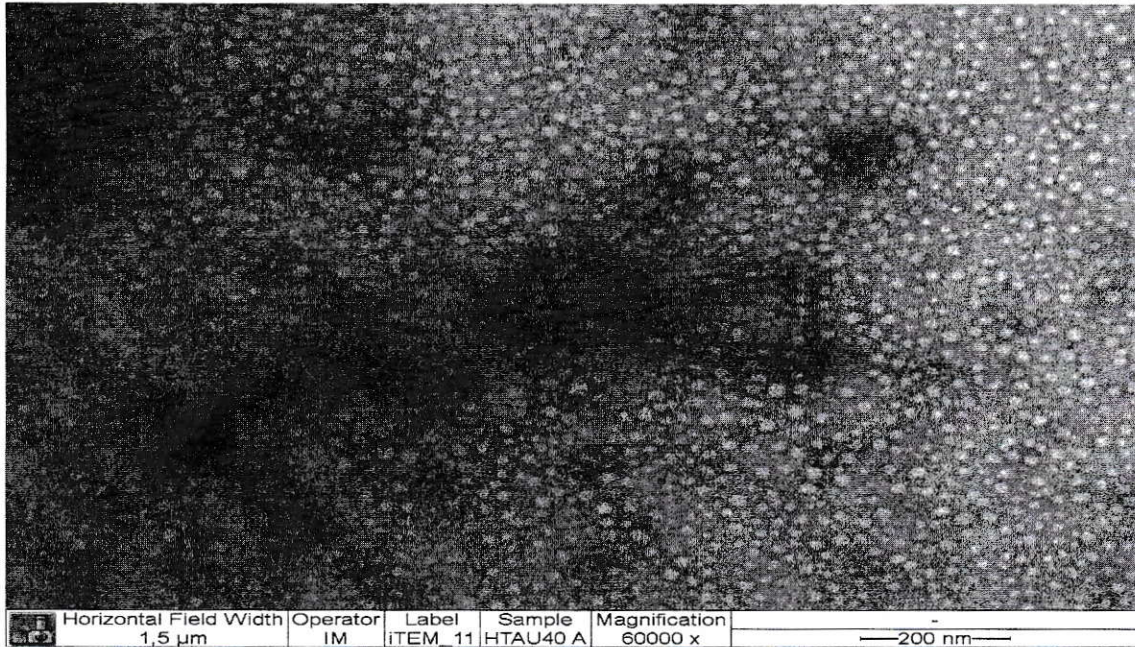


Figura 5. Microfotografía electrónica mostrando polímeros de proteína tau recombinante (htau40), agregada con ácido araquidónico (CAA) 75µM.

Cultivo primario microglial a partir de ratas neonatas.

La obtención de células microgliales, fue basada en el protocolo de cultivo a partir de tejido mixto y ajustada a las condiciones del laboratorio descritas por Lue y colaboradores (Lue et al., 1996). Previo al cultivo, el día anterior, se dejaron botellas T-75 con 5mL de poli-L-lisina filtrada a 1mg/mL de concentración en incubador a 37°C. Al día siguiente se retiró la poli-L-lisina de las botellas y el sobrante por aspiración mediante tres lavados con agua estéril.

A partir de ratas neonatas, se extrajo el cerebro completo y se colocó en placa Petri con solución salina balanceada de Hank's (HBBS) a 4°C. Se retiraron las meninges y el cerebelo, transfiriendo los hemisferios a otra placa Petri donde fueron lavados 3 veces con solución de Hank's a 4°C. Se colocaron 500µL de tripsina 1X por cerebro y mediante bisturí se procedió a disgregar mecánicamente, dejándose en incubación por 10

minutos a 37°C. Se neutralizó la tripsina a razón de 1:2 con medio DMEM/F12/10% FBS/1% antibiótico, homogenizándose el tejido mediante la utilización de pipetas estériles. Posteriormente el homogenizado fue centrifugado a 1000 RPM por 10 minutos a temperatura ambiente. El pellet obtenido fue resuspendido en 16mL de DMEM, alicuotándose 4mL por botella, para luego poner a incubar toda la noche en ambiente controlado a 37°C con 5% CO₂ (incubadora *Forma Scientific*). El resto de los gases representa el 95% y se encuentra en equilibrio con los gases encontrados en el aire.

Al día siguiente se descartó el medio y se reemplazó por 15mL medio fresco. La mantención de los cultivos requirieron de un cambio de medio cada 48 horas durante un período de 10 días hasta su tratamiento final. En el período de cosecha, los cultivos son agitados durante 2 horas a 160 rpm. Una vez terminado este proceso, se eliminó todo el medio de cultivo, y se reemplazó por medio fresco. Finalmente, los cultivos son nuevamente puestos en agitación a 160 rpm durante 24 horas para su posterior utilización.

Inmunofluorescencia de células microgliales

Las microglías fueron cultivadas en cubreobjetos dispuestos en placas de 24 pocillos por 24 horas en ambiente controlado a 37°C con 5% CO₂ (incubadora *Forma Scientific*). El resto de los gases representa el 95% y se encuentra en equilibrio con los gases encontrados en el aire. Luego fueron lavadas con PBS 1X estéril por 5 minutos bajo campana a temperatura ambiente. Se retiró el PBS 1X y las células se incubaron en una solución de fijación que contenía 4% de paraformaldehído y 4% de sacarosa por 30 minutos a 37°C. Se lavaron 3 veces con PBS 1X durante 5 minutos y a continuación los cubreobjetos se bloquearon por 1 hora con PBS1X/BSA 5% a temperatura ambiente, o a 4°C toda la noche. Nuevamente se lavaron 3 veces con PBS 1X durante 5 minutos

seguido de la incubación en cámara húmeda y oscura del anticuerpo Faloidina oregon Green 488 (1:300) en PBS 1X/BSA 1% por 1 hora a T ambiente. Los cubreobjetos se lavaron 3 veces en PBS 1X por 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se incubó con el segundo anticuerpo TOPRO (1:400) en PBS 1X/BSA 1% por 15 minutos a T ambiente.

Los cubreobjetos fueron lavados 3 veces con PBS 1X por 5 minutos y a continuación se procedió a sumergir los cubreobjetos en H₂O estéril dejándolos escurrir en toalla absorbente. Se montaron en portaobjetos con una gota de medio de montaje FluorSave y se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente son almacenados a 4°C en oscuridad. Cada experimento fue presentado en triplicado y las imágenes de las células fueron capturadas con el microscopio confocal de fluorescencia CARL ZEISS modelo Lampa 510 META con aumento de 20X.

Cultivo primario de neuronas hipocampales a partir de embriones de rata.

El protocolo de obtención y cultivo de neuronas hipocampales de ratas embrionarias fue adaptado de Mingwei Ni *et al.*, 2010 (Ni & Aschner, 2010). Previo al cultivo, el día anterior, se dejó una placa de 24 pocillos con cubreobjetos, y con 500µL de poli-L-lisina filtrada a 1mg/mL de concentración en incubador a 37°C y 5% de CO₂ (el resto de los gases representa el 95% y se encuentra en equilibrio con los gases encontrados en el aire). Al día siguiente se retiró la poli-L-lisina de los pocillos y el sobrante por aspiración mediante tres lavados con agua estéril.

A partir de una rata preñada Sprague dowley, se extrajeron embriones de 18 días de desarrollo embrionario (E18) que fueron depositados en una placa Petri con solución salina de Hank's a 4°C. Luego se realizó un corte en el cuello de cada embrión dejando sus cabezas en una nueva placa con solución salina Hank's a 4°C. Se removieron los

cerebros y se extrajeron los hipocampos retirando cuidadosamente las meninges y evitando arrastrar parte de la corteza cerebral.

Una vez depositados los hipocampos en una nueva placa Petri, bajo campana de flujo laminar se aspiró el medio salino utilizando pipeta Pasteur y se agregó 4,5mL de solución salina de Hank's + 0,5mL de tripsina 2,5% incubándose por 20 minutos a 37°C. Se traspasó todo el volumen a un tubo de 15mL con pipeta Pasteur y se esperó a que precipitaran los hipocampos, descartando el sobrenadante. Se lavó dos veces con 4mL de solución salina de Hank's y se reemplazó por 5mL de medio neurobasal de plaqueo. Posteriormente los hipocampos fueron resuspendidos utilizando pipetas Pasteur que fueron previamente flameadas para obtener 3 tamaños distintos. Se contaron las células resuspendidas y se sembraron 15.000 en cada pocillo llevándose a un volumen final de 800µL con medio neurobasal de plaqueo.

Finalmente se incubaron las células por 1 hora y media a 37°C en incubadora con 5% CO₂ (el resto de los gases representa el 95% y se encuentra en equilibrio con los gases encontrados en el aire) y el medio se reemplazó con 800µL de medio neurobasal de mantención, dejándose el cultivo durante 24 horas para su posterior utilización.

Inmunofluorescencia de neuronas hipocampales

Las neuronas fueron cultivadas en cubreobjetos dispuestos en placas de 24 pocillos por 24 horas. Luego fueron lavadas con PBS 1X estéril por 5 minutos bajo campana a temperatura ambiente. Se retiró el PBS 1X y las células se incubaron en una solución de fijación que contenía 4% de paraformaldehído y 4% de sacarosa por 30 minutos a 37°C. Se lavaron 3 veces con PBS 1X durante 5 minutos y a continuación los cubreobjetos se bloquearon por 1 hora con PBS1X/BSA 5% a temperatura ambiente o a 4°C toda la noche. Nuevamente se lavaron 3 veces con PBS 1X durante 5 minutos seguido de la incubación en cámara húmeda y oscura del anticuerpo Faloidina oregon Green 488

(1:300) en PBS 1X/BSA 1% por 1 hora a T ambiente. Los cubreobjetos se lavaron 3 veces en PBS 1X por 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se incubó con el segundo anticuerpo Anti IgG mouse-TRITC (1:200) en PBS 1X/BSA 1% por 45 minutos a T ambiente. Se lavó una vez más en PBS 1X por 5 minutos y se incubó con el anticuerpo de tinción nuclear TOPRO (1:500) por 15 minutos.

Los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS 1X por 5 minutos y a continuación se procedió a sumergir los cubreobjetos en agua estéril dejándolos escurrir en toalla absorbente. Se montaron en portaobjetos con una gota de medio de montaje FluorSave y se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente son almacenados a 4°C en oscuridad. Cada experimento fue presentado en triplicado y las imágenes de las células fueron capturadas con el microscopio confocal de fluorescencia CARL ZEISS modelo Lampa 510 META con un aumento de 20X.

Activación microglial y obtención de “medio condicionado”

Se cultivaron 15.000 células microgliales en cubreobjetos depositados en placa de 24 pocillos en 500µl de medio DMEM + F12 + FBS 10% + Antibiótico 1X y se dejaron en incubador por 1 hora a 37°C y 5% CO₂ (el resto de los gases representa el 95% y se encuentra en equilibrio con los gases encontrados en el aire. Luego se aspiró el sobrenadante, se reemplazó por medio fresco y se dejó en incubador 24 horas a 37°C y 5% CO₂.

Al día siguiente el medio fue reemplazado por medio Neurobasal libre de suero y se incubaron por 24 horas. Luego las células fueron estimuladas con LPS (10 µg/mL), buffer de agregación (HEPES1M + AA 2mM), htau40 agregada (10, 25 y 50µg/mL) por 24 horas y posteriormente se recuperó el medio condicionado guardando una alícuota a -80°C para medir nitritos, citoquinas, y el resto para exponerlo a las neuronas.

Ensayo de nitritos

Los nitritos fueron medidos a partir del sobrenadante de los cultivos microgliales estimulados con htau40 agregada como un indicador de la producción de NO. Como control negativo se utilizó el medio de cultivo microglial uncubado con el buffer de agregación y como control positivo LPS a 10 µg/mL de concentración. La producción de nitritos fue medida por reacción de Griess. Brevemente, 50µl del medio de cultivo microglial fue incubado con 10µl de EDTA 0.5M y 60µl de reactivo de Griess por 5 minutos. La absorbancia fue determinada a 550nm usando un lector de microplaca Sunrise (TECAN).

Determinación de citoquinas por ELISA

Las concentraciones de citoquinas de rata IL-6 y TNF α , secretadas del medio de cultivo microglial fueron medidas por el kit comercial de ELISA (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.) según especificaciones del fabricante.

Estimulación de neuronas hipocampales con medio condicionado microglial.

Se cultivaron 15.000 neuronas hipocampales en cubreobjetos colocados en placas de 24 pocillos durante 24 horas en incubador a 37°C y 5% de CO₂. Luego de este período se removió el medio por aspiración y las neuronas se expusieron al medio condicionado proveniente de microglías activadas incubándose por 24 horas a 37°C y 5%CO₂. Posteriormente las células fueron fijadas para su visualización y cuantificación por inmunofluorescencia.

Análisis morfométrico de neuronas hipocampales

El proceso de cuantificación se basó en el método utilizado por Correa y Longart (Correa & Longart, 2010) para 6 experimentos independientes con tres réplicas cada uno. Se consideraron 30 mediciones para cada experimento y se procedió al conteo de neuritas en cada célula observada y a la medición de cada una de estas.

La longitud promedio de neuritas por célula se obtuvo mediante la división de la longitud total de las neuritas marcadas con Faloidina entre el total de neuronas contadas. El mismo criterio se utilizó para determinar el número de neuritas por célula. Todas las cuantificaciones se realizaron de manera independiente para cada tratamiento y los resultados mostrados representan el promedio con su error estándar ($X \pm SEM$).

Análisis de datos

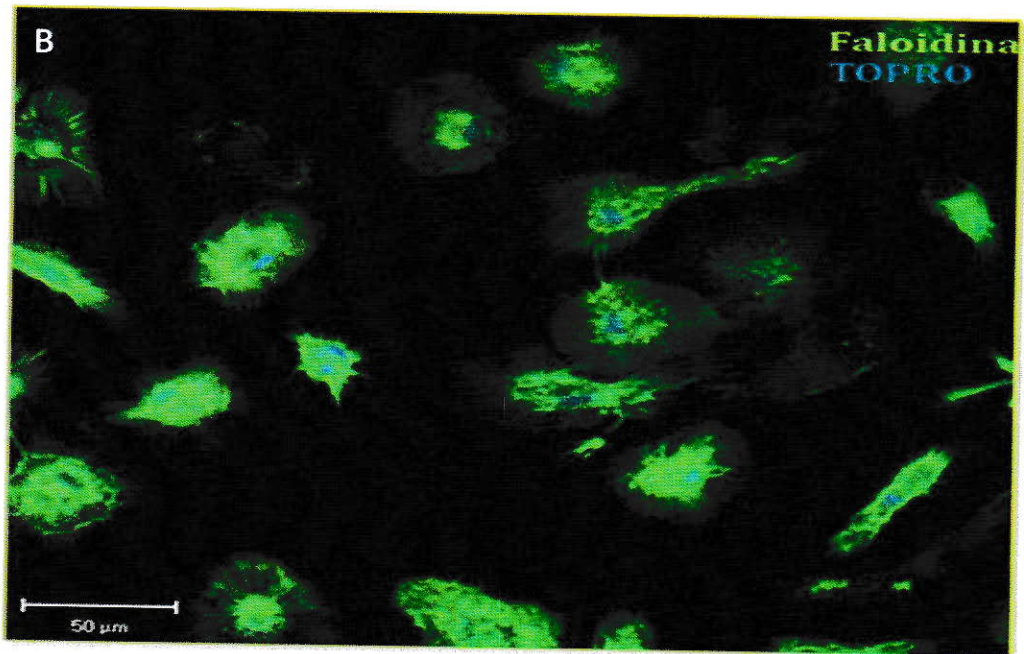
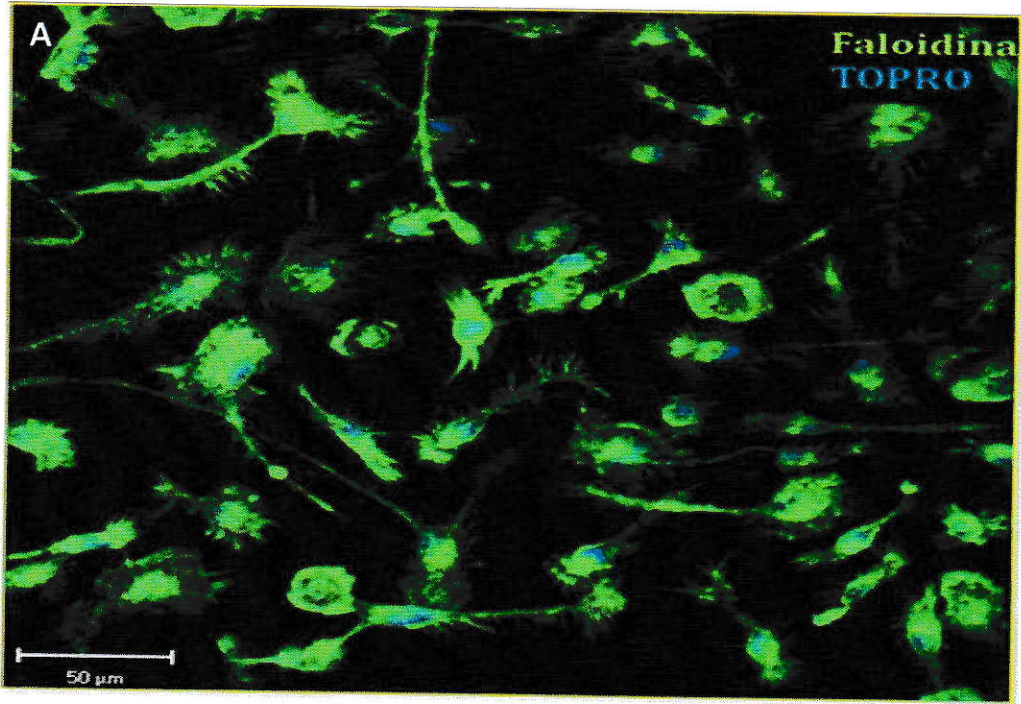
Los valores fueron presentados como la media \pm error estándar. El análisis estadístico fue realizado usando un ANOVA de una vía mediante programa GraphPad Prism, junto con el test de comparación múltiple de Bonferroni. Diferencias de $p < 0.05$ fueron estadísticamente significativas.

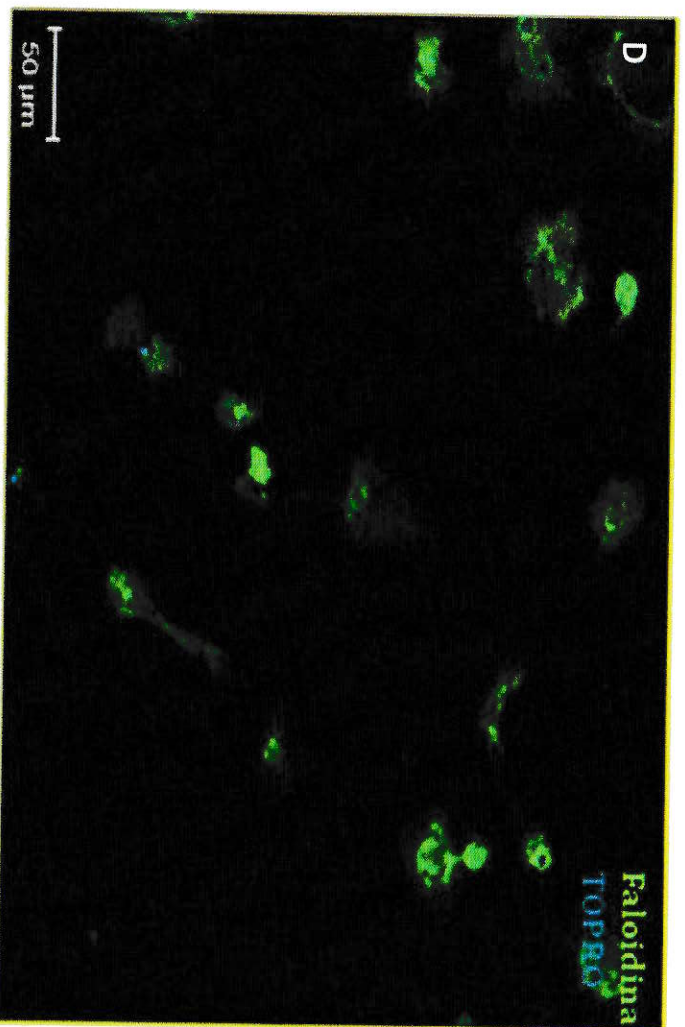
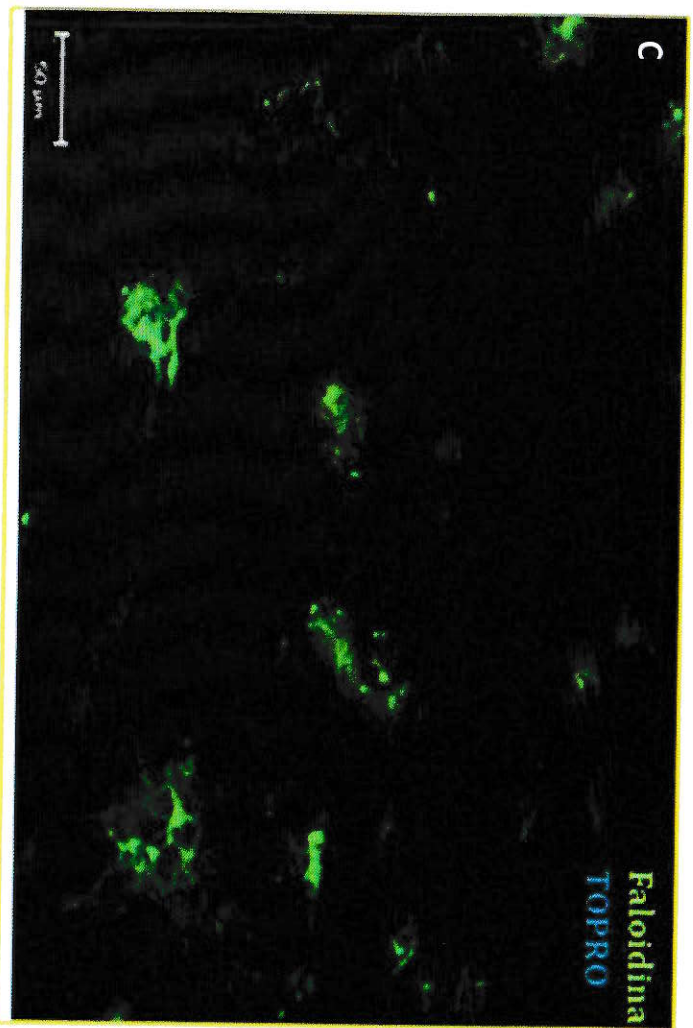
El análisis de imágenes para el estudio morfométrico en neuronas hipocampales se hizo en el programa Zeiss LSM Image Browser versión 4.0.

RESULTADOS

Morfología de microglías en cultivo primario activadas a concentraciones crecientes de la proteína tau humana (htau40).

La activación de microglías se caracteriza por drásticos cambios morfológicos en su cuerpo celular. Las inmunofluorescencias permitieron la inmunomarcación del citoesqueleto de actina usando faloidina, mostrando prolongaciones alargadas, con núcleos pequeños en el caso del control con ácido araquidónico (CAA) a 75 μM (6A), En el caso de la activación por htau40 agregada se observaron cambios morfológicos evidentes: las microglías retrajeron sus prolongaciones adquiriendo una forma ameboidal con un soma de mayor tamaño que se asemeja a lo observado en el control positivo de activación LPS 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 6B) y que contrasta con el control CAA, figuras 6C) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 6D) 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 6E) 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente).





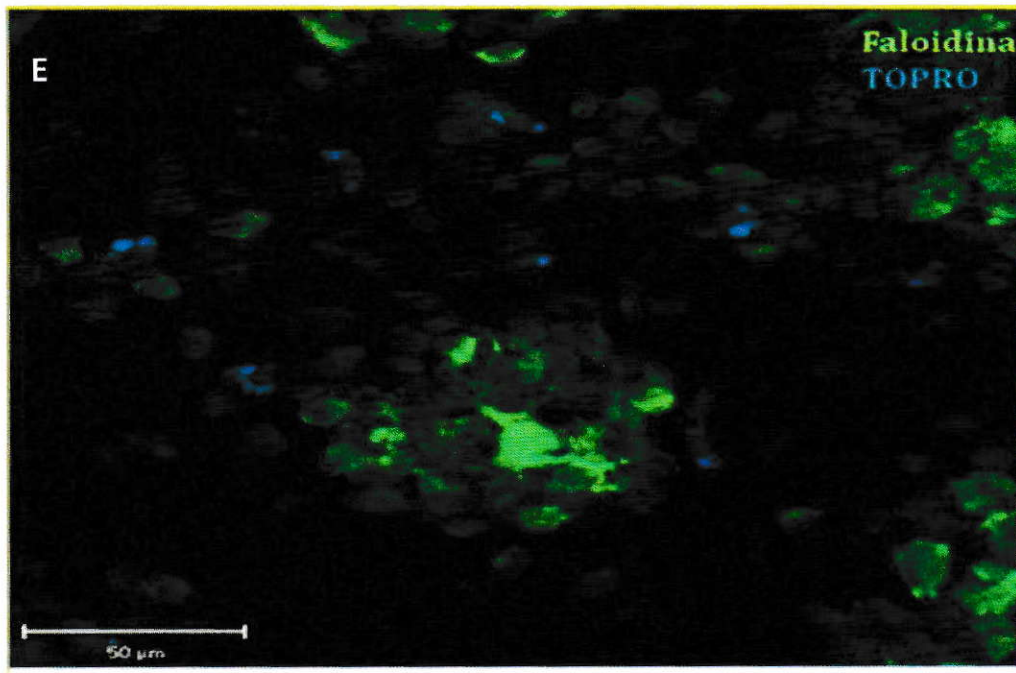


Figura 5. Inmunofluorescencia de células microgliales de cultivo primario de rata estimuladas por 24 horas con: A) Control buffer Acido Araquidónico (CAA) 75 μ M; B) Control positivo de activación LPS 10 μ g/mL; C) 10 μ g/mL de htau40 agregada; D) 25 μ g/mL de htau40 agregada y E) 50 μ g/mL de htau40 agregada. Las células fueron fijadas en PFA 4%/Sacarosa 4%. Para inmunofluorescencia (IF) se tiñeron núcleo y citoesqueleto de actina (TOPRO 1:400 y faloidina 1:300, respectivamente). Escala 50 μ m, aumento 20X.

Activación de microglías

Basándose en la hipótesis de neuroinmunomodulación, se estimuló por 24 horas a células microgliales en cultivo con concentraciones crecientes de proteína htau40 agregada. En este contexto, además de los cambios morfológicos se evaluaron algunos parámetros bioquímicos en las células gliales y se analizó su activación mediante la producción de nitritos como un indicador de la producción de óxido nítrico (NO) (Figura 7).

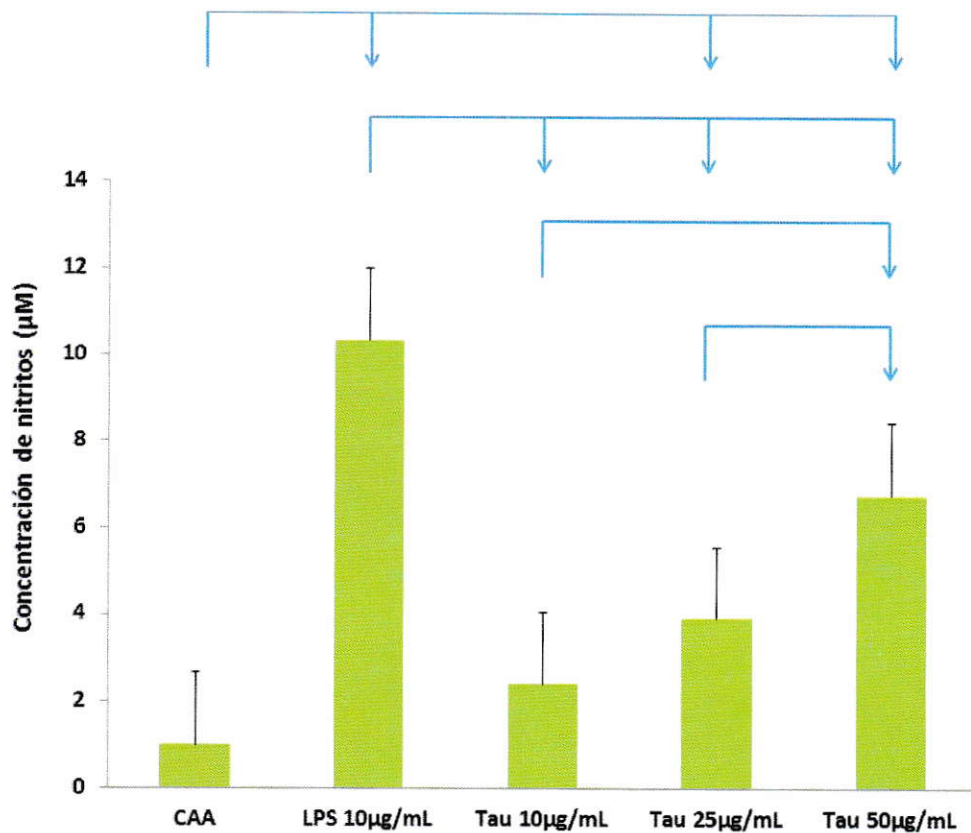


Figura 7. Medición de nitritos en medio condicionado microglial. De izquierda a derecha: i) Control buffer Acido Araquidónico (CAA) 75µM; ii) Control positivo de activación, LPS 10µg/mL; iii) 10µg/mL de httau40 agregada; iv) 25µg/mL de httau40 agregada y v) 50µg/mL de httau40 agregada. Las células microgliales fueron estimuladas por 24 horas. Las barras representan la media \pm SEM (error estándar) de 5 experimentos independientes repetidos 10 veces cada uno. La significancia fue obtenida a partir del análisis de varianza ANOVA de una vía ($p < 0.05$).

En cuanto a la liberación de factores proinflamatorios, se analizó por ensayo de ELISA, las citoquinas IL-6 y TNF α en el medio recogido de cultivos microgliales estimulados con la proteína httau40 agregada por 24 horas (Figura 8).

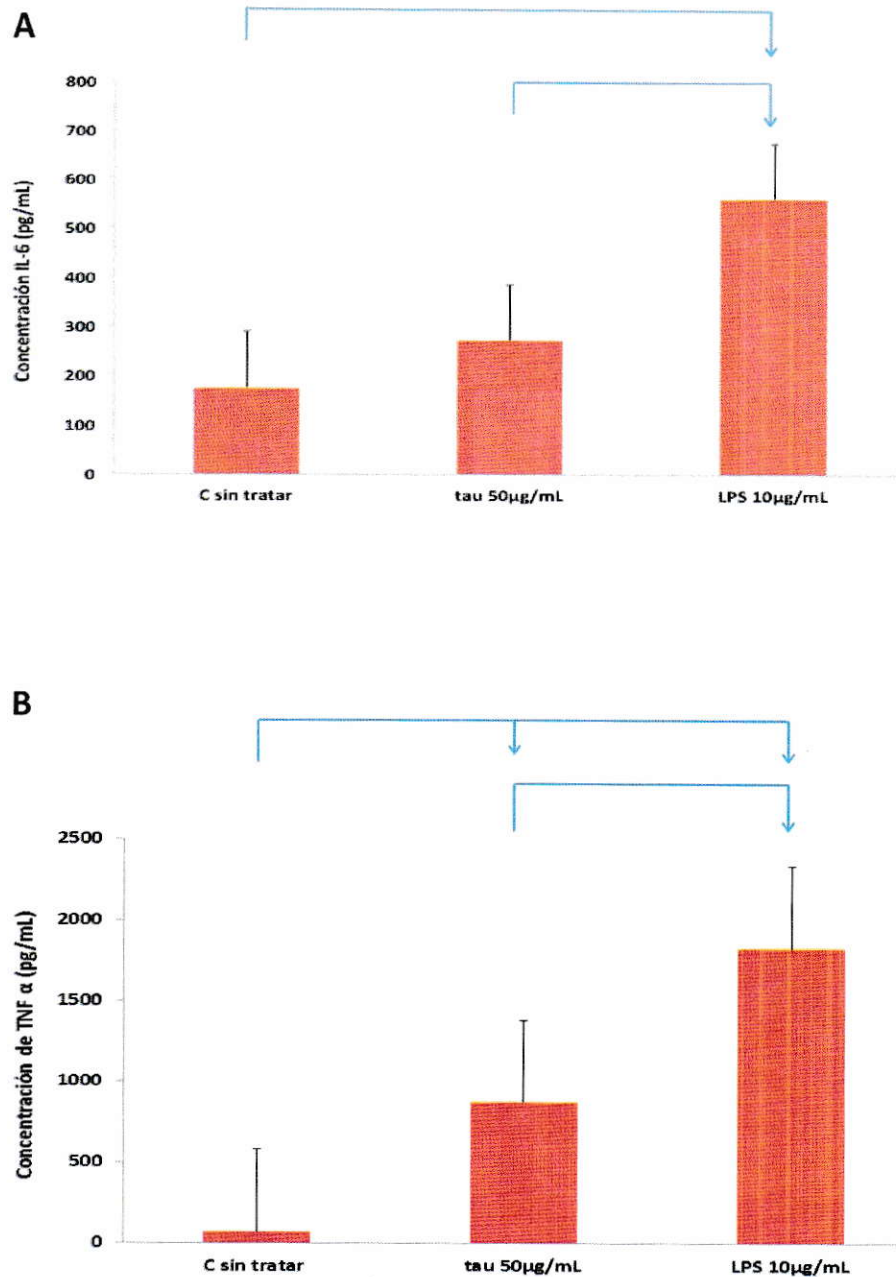
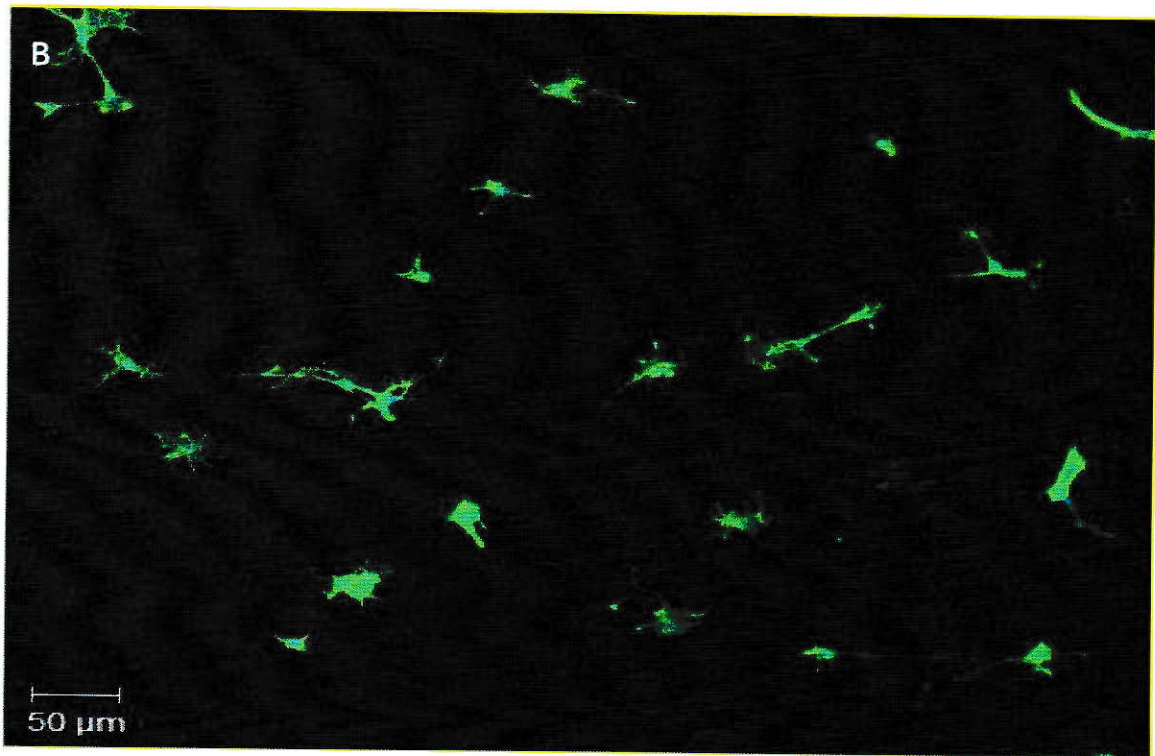
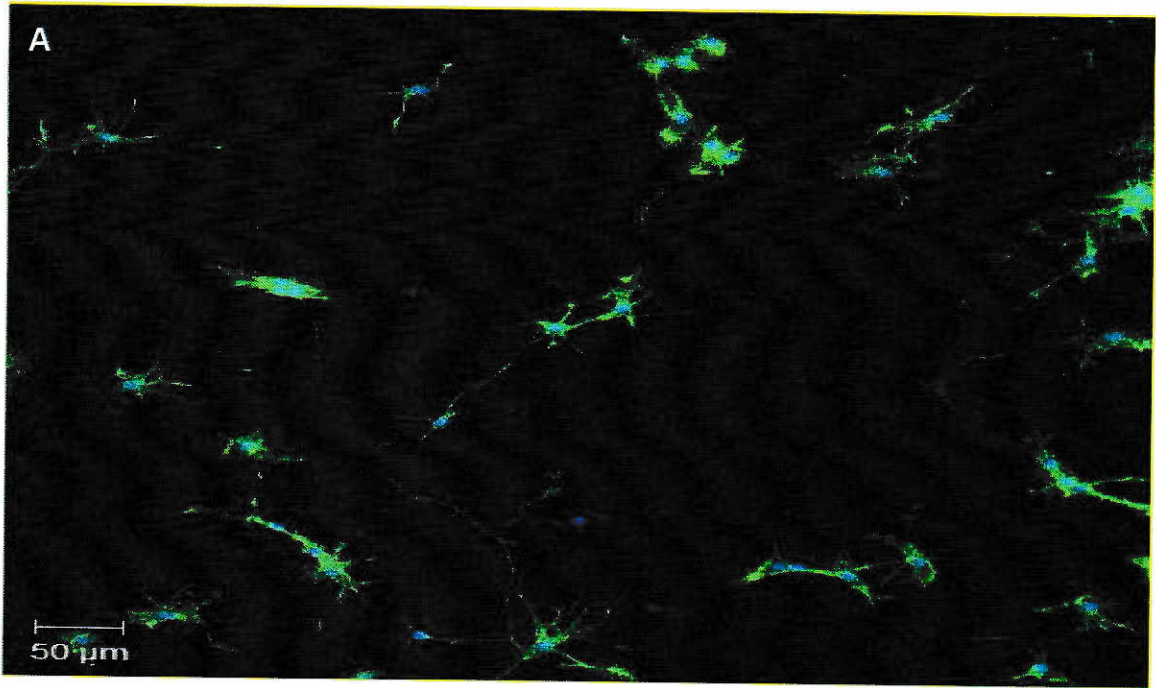
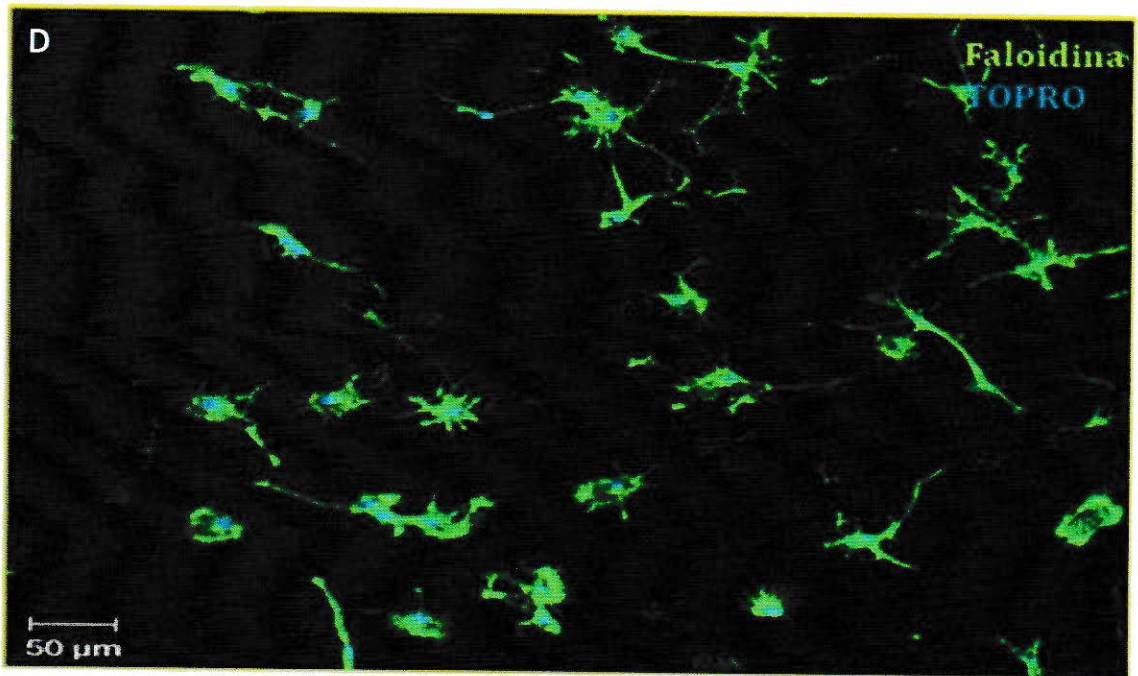
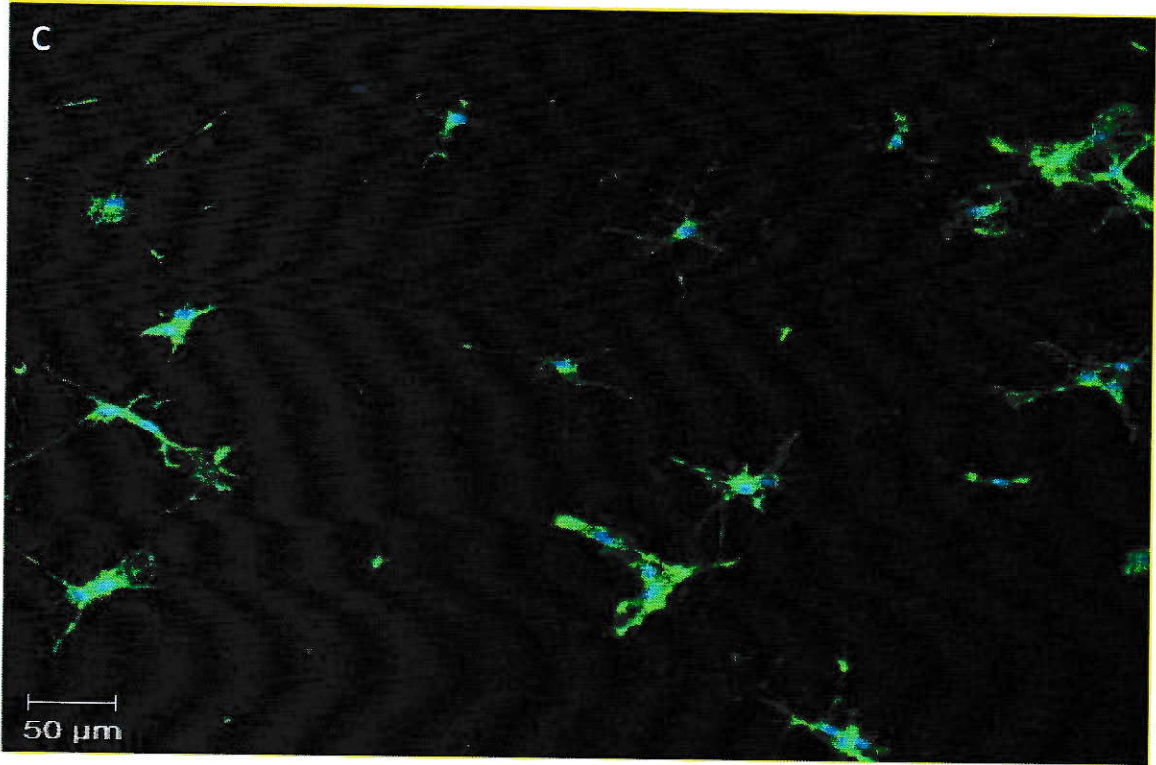


Figura 8. Producción de mediadores inflamatorios microgliales A) IL-6 y B) TNF α . Las células microgliales fueron estimuladas por 24 horas con: i) Control sin tratar; ii) 50µg/mL de htau40 agregada y iii) Control positivo de activación LPS 10µg/mL. Las barras representan la media \pm SEM (error estándar) de 3 experimentos independientes repetidos 6 veces. La significancia fue obtenida a partir del análisis de varianza ANOVA de una vía ($p < 0.05$).

Efectos de medios condicionados de microglías sobre morfología en neuronas hipocampales de rata.

Para estos estudios, el medio en que se cultivaron neuronas hipocampales desde cultivos primarios fue reemplazado por el medio condicionado fresco proveniente de células microgliales activadas con tau humana htau40 agregada, dejando un tiempo de incubación de 24 horas para observar posibles cambios morfológicos. En la Figura 9A, las neuronas estimuladas con el control buffer ácido araquidónico (CAA) a 75 μ M de concentración, mostraron neuritas con una longitud promedio por célula de 51,31 μ m (\pm 15,28 μ m) (Figura 9A), 10 μ g/mL de htau40 agregada con neuritas de 64,53 μ m (\pm 13,85 μ m) de longitud promedio por célula cercano a los valores control (Figura 9B), 25 μ g/mL de htau40 agregada con una longitud promedio por célula de 33,12 μ m (\pm 16,96 μ m) (Figura 9C) y con 50 μ g/mL de htau40 agregada con neuritas de longitud promedio por célula de 18,08 μ m (\pm 6,94 μ m) cercanos a los valores con LPS (Figura 9D). LPS 10 μ g/mL un control positivo de activación, mostró neuronas con neuritas de 12,87 μ m (\pm 4,27 μ m) de longitud promedio por célula (Figura 9E). En cuanto al número de neuritas no se observaron mayores diferencias entre los diferentes experimentos, y se obtuvo un promedio de 4 neuritas por célula en cada tratamiento (Tabla 3). Interesantemente la longitud de las neuronas observada, así cuando fueron tratadas con medio condicionado de la glía activada por concentraciones crecientes de tau patológica se observó una disminución gradual en la longitud de los procesos, sugiriendo cambios neurodegenerativos (Figura 10).





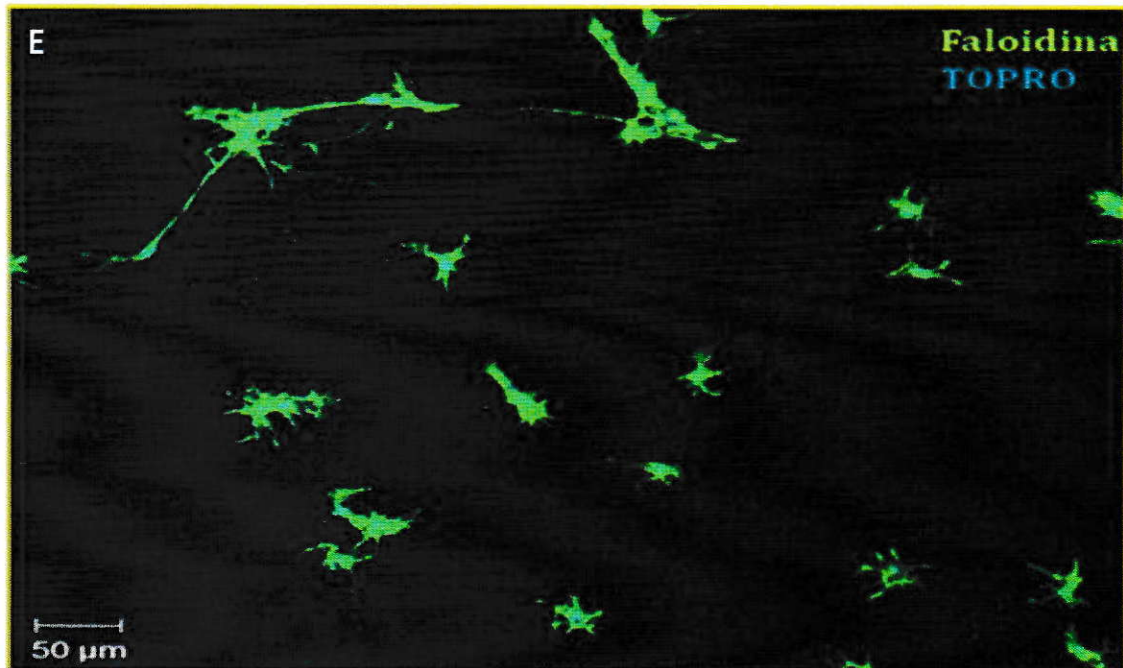


Figura 9. Neuronas hipocampales expuestas a medio condicionado microglial. A) Control buffer ácido araquidónico (CAA) 75μM; B) control positivo de activación LPS 10μg/mL; C) 10μg/mL htau40 agregada; D) 25μg/mL de htau40 agregada y E) 50μg/mL de htau40 agregada. Escala 50μm, aumento 20X.

Tabla 3. Mediciones morfométricas de número y longitud de neuritas en neuronas hipocampales de rata. Los valores fueron presentados como la media ± error estándar.

	Control AA	LPS 10μg/mL	Tau 10μg/mL	Tau 25μg/mL	Tau 50μg/mL
Promedio neuritas/célula	4.00 ± 1.50	3.75 ± 1.48	3.75 ± 0.87	4.54 ± 1.62	3.97 ± 1.27
Promedio longitud de neuritas/célula (μm)	51,31 ± 15,28	12,87 ± 4,27	64,53 ± 13,85	33,12 ± 16,96	18,08 ± 6,94

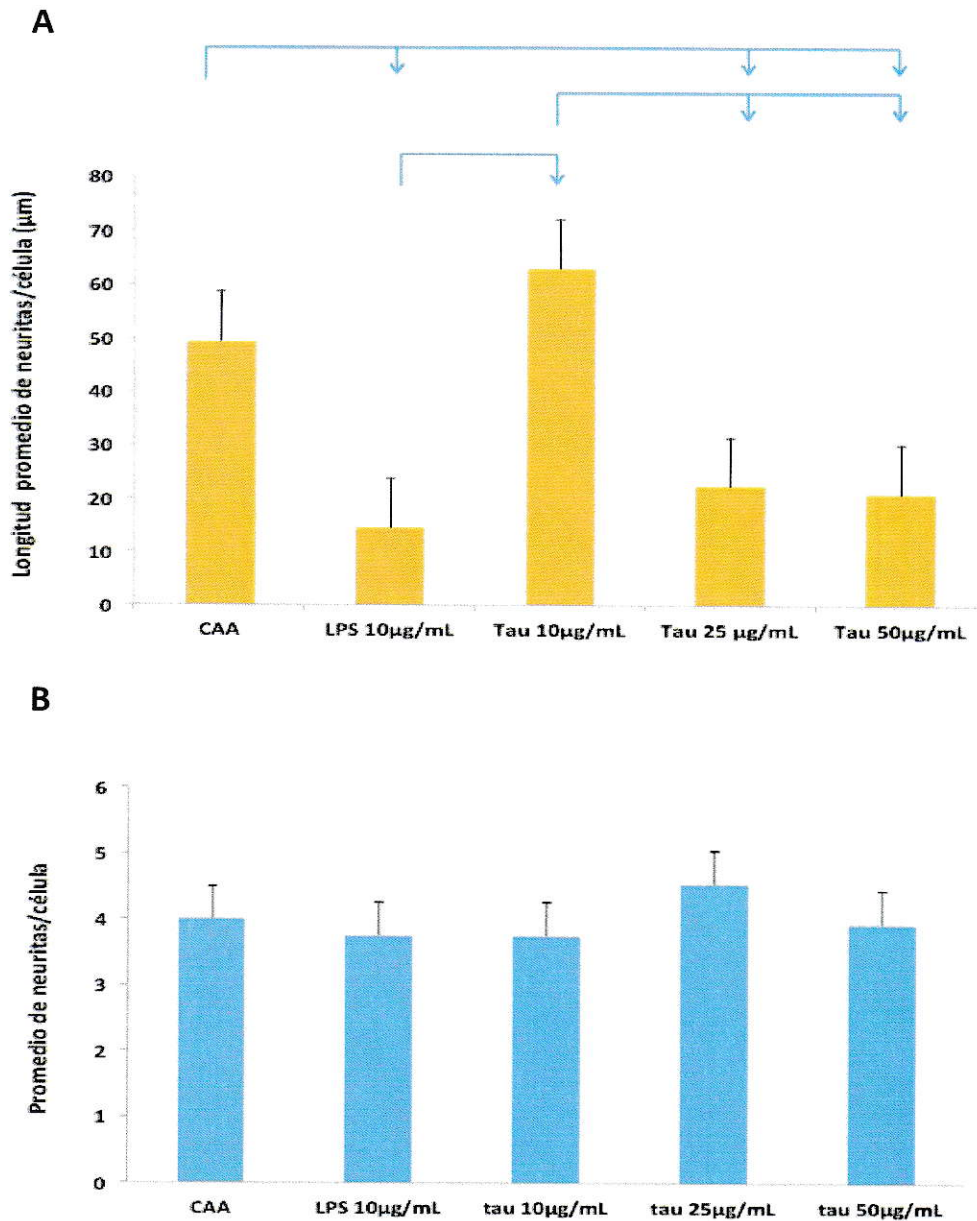


Figura 10. A y B; Número y longitud promedio de neuritas de neuronas hipocampales respectivamente. Las células fueron estimuladas por 24 horas con medio condicionado proveniente de microglías tratadas con i) control buffer ácido araquidónico (CAA) 75µM; ii) control positivo de activación LPS 10µg/mL; iii) 10µg/mL htau40 agregada; iv) 25µg/mL de htau40 agregada; y v) 50µg/mL de htau40 agregada. Las barras representan la media \pm SEM (error estándar) de 5 experimentos independientes repetidos 3 veces. La significancia fue obtenida apartir del análisis de varianza ANOVA de una vía ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

La enfermedad de Alzheimer es un puzzle para la investigación médica, la industria farmacéutica y para la sociedad en general. La creciente incidencia de ésta y el aumento progresivo de casos de Alzheimer en sujetos menores de 40 años apunta a la necesidad de encontrar soluciones efectivas para su diagnóstico temprano y tratamiento (Farias et al., 2014). Así, la lentitud en encontrar una solución terapéutica para controlar la EA se ha debido en gran parte a la falta de un esquema conceptual coherente sobre su patogénesis y sus causas. Ello ha frenado a su vez el desarrollo de nuevos fármacos, o desviado su búsqueda debido a que se ha realizado sobre blancos equivocados (Maccioni, 2011). Así, esfuerzos, poco fructíferos, se han orientado en los últimos 20 años hacia moléculas que controlan las placas seniles de A β (1-42). En ese contexto, y buscando una visión unificadora de los resultados sobre la etiopatogénesis de la EA, hemos planteado la hipótesis de la “Neuroinmunomodulación”, la cual ha ido encontrando gradualmente una sólida correlación con la clínica (Maccioni & Perry, 2009, Farias et al., 2014). Postulamos que múltiples señales de daño (hierro redox, agentes oxidantes, LDL, insulinopatías, entre otros.) activarían por inmunidad innata la

microglía, con inducción de NF κ B y liberación de citoquinas pro-inflamatorias (Fernandez et al., 2008, Maccioni et al., 2009, Maccioni et al., 2010). De esta manera se gatillarían procesos anómalos de señalización que llevan a la desregulación de quinasas y fosfatasas, con la consecuente hiperfosforilación de tau, su autoagregación y neurodegeneración (Fernandez et al., 2008, Rojo et al., 2008, Maccioni et al., 2009, Morales et al., 2010). Las modificaciones patológicas en tau constituyen el producto final común de las alteraciones celulares en el “*cross-talks*” entre neuronas y microglía (Maccioni et al., 2010). También se han realizado investigaciones que buscan entender la forma de activación de células microgliales en cultivo, expuestas a proteína tau en estado agregado, como desencadenante del proceso neurodegenerativo en la patogénesis de la EA (Morales et al., 2010, Farias et al., 2011).

Morfología de microglías en cultivo primario activadas a concentraciones crecientes de proteína tau humana agregada (htau40).

Para evaluar la acción de la proteína tau agregada como señal de daño sobre células de la microglía se plantearon tres procedimientos: observación morfológica mediante inmunofluorescencia, medición de la concentración de nitritos liberados al medio de cultivo y medición de la secreción de citoquinas proinflamatorias, particularmente IL-6 y TNF α .

Nuestros estudios con cerebros de rata neonatas, permitieron obtener cultivos primarios de microglías suficientemente puros, los cuales fueron sometidos a diferentes concentraciones de htau40 agregada (ver Figura 6). El uso de LPS como control positivo permitió diferenciar los cambios morfológicos asociados a la activación patológica de la microglía, ya que activa receptores específicos llamados TLR4 abundantemente expresados en su superficie y que son esenciales para que la microglía monte una respuesta inmune (Kettenmann et al., 2011). La incubación de la microglía con el buffer de agregación (libre de tau) se usó como control negativo (CAA, Figura 5A) para evaluar si tau por sí misma es un estímulo activador. La observación celular vista mediante inmunofluorescencia con el marcador de faloidina para el citoesqueleto de actina, revelaron que la exposición de microglías a diversas concentraciones de tau agregada indujeron cambios en su morfología, de un estado quiescente, caracterizado por un soma pequeño y procesos ramificados denominado “fenotipo fagocítico” (consistente con lo observado en la figura 5A), a un estado activado donde los procesos se retraen y el soma se ensancha denominado “fenotipo ameboide” consistente con la morfología observada para LPS (Figura 5E), lo que supone una redistribución del citoesqueleto de actina (Uhlenmann et al., 2015). A concentraciones crecientes de tau agregada (Figura 5C y D) la retracción de los procesos se hace más evidente semejando la morfología vista para LPS. Las observaciones para CAA no mostraron cambios en la morfología, lo que sugiere que la tau agregada inicia los cambios morfológicos y bioquímicos en las células de microglía,

primer evento río arriba en la cascada de la neurodegeneración (Gomez-Ramos et al., 2006) (Majerova et al., 2014).

Activación de microglías

La expresión de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS) es uno de los cambios característicos de la activación glial durante la respuesta inflamatoria. La producción de óxido nítrico (NO) como consecuencia de la inducción de esta isoforma en las células gliales se ha observado en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas (Brown & Bal-Price, 2003). El NO es un mensajero fisiológico de vida corta que puede comportarse como molécula citotóxica para las propias células del organismo durante enfermedades, siendo capaz de generar derivados muchos más reactivos como los nitritos (NO_2^-) (Moncada & Higgs, 1993). Este compuesto al ser más estable que el NO (que es un gas), es útil como indicador indirecto de activación microglial. Para evaluar esta activación se utilizaron células de la microglía de rata incubadas con concentraciones crecientes de proteína tau agregada.

La producción de nitritos mostró ser significativa a mayores concentraciones de htau40 agregada (Figura 7D y E), lo que apoya fuertemente su papel como elemento gatillante de la activación microglial (Morales et al., 2010), alteración inflamatoria presente de forma constante en la enfermedad de Alzheimer. Dado que tau agregada de $10\mu\text{g/mL}$ ejerció un efecto similar al control (Figura 7A), se puede concluir que las mayores

concentraciones son requeridas para inducir la expresión iNOS, lo que conlleva un exceso de NO y a una mayor producción de nitritos (Kovac et al., 2011).

iNOS normalmente no se expresa en el cerebro sano pero se requiere para su inducción la presencia de elevados niveles de varias citoquinas proinflamatorias, lo que sugiere que esta isoforma no desempeña su papel en la fisiología normal del SNC (Kettenmann et al., 2011). Considerando este antecedente es plausible considerar que los agregados de tau en altas concentraciones constituyan una señal de daño que induce altos niveles de expresión de iNOS con la consecuente producción de NO (Kovac et al., 2011).

Liberación de mediadores proinflamatorios

La microglía posee la capacidad de responder frente al deterioro del tejido nervioso en situaciones de enfermedad experimentando cambios morfológicos y funcionales de manera gradual, acompañados por la producción de citoquinas proinflamatorias lo que se denomina “glía activada” siendo capaz de amplificar la respuesta inflamatoria jugando un papel muy importante en trastornos neurológicos como el Alzheimer. (Raivich et al., 1999, Van Rossum & Hanisch, 2004)

En el SNC normal la expresión de estas citoquinas es limitada, pero su producción se induce rápidamente después de una lesión tisular, infecciones o inflamación (Allan & Rothwell, 2001). Siguiendo este punto se evaluó la liberación de dos importantes citoquinas proinflamatorias (IL-6 y TNF- α), producidas por células de la microglía

estimuladas con htau40 agregada. Para ello se consideró la mayor concentración de proteína agregada (50µg/mL), basado en los resultados de producción de nitritos, donde esta variable fue significativamente distinta del resto de las condiciones experimentales (Figura 7E). Esta condición mostró un efecto en la liberación de IL-6 (Figura 8B) semejante al control (Figura 8A), lo que lleva a suponer al menos tres posibles causas: 1) el número de réplicas consideradas para esta medición es muy pequeño (lo que refleja el alto valor del error estándar; 2) la concentración de tau agregada propuesta no es suficiente para estimular la producción y posterior liberación de IL-6, para que tenga un valor estadístico significativo y 3) esta citoquina se expresa más tardíamente cuando se ha alcanzado una mayor concentración de agregados de tau. Bajo la misma condición (Figura 9B), la liberación de TNF-α fue significativamente distinta a la condición control y a LPS (Figura 9A y 9C), sugiriendo que esta citoquina tiene un papel central en iniciar una respuesta inflamatoria (Hanisch, 2002).

La liberación de los mediadores inflamatorios TNF-α (que fue estadísticamente significativo) e IL-6 bajo las condiciones experimentales propuestas, estuvieron por debajo de los valores de concentración de aquellos descritos por Kovac y colaboradores (Kovac et al., 2011), considerando la falta de modificaciones post-traduccionales de tau, que pudiesen resultar inmunogénicas para producir mayores niveles de liberación de citoquinas pro-inflamatorias (Kovac et al., 2011, Selenica et al., 2014).

A su vez, los resultados obtenidos en la medición de nitritos y citoquinas sugieren que la neurotoxicidad de tau está también ligada a las posibles modificaciones post-traduccionales que sufre esta proteína y no solo a sus niveles de agregación, siendo la hiperfosforilación de tau uno de los más importantes (Farias et al., 2011).

La proteína tau es reconocida como una molécula que interactúa con actina además de los microtúbulos (Cross et al., 1993) estando involucrada en la organización de la red citoesquelética (Henriquez et al., 1995). En ensayos de unión utilizando el sistema de soporte en fase sólida de ELISA, la asociación de tau con tubulina inmovilizada fue inhibida por monómeros de actina y esta inhibición fue mayor cuando se utilizaron filamentos preformados de actina (Farias et al., 2002), demostrando la importancia fisiológica de la **interacción entre tau y actina**. Más aún Fulga y colaboradores (Fulga et al., 2007) han proporcionado evidencia de que tau induce cambios en la organización y estabilidad de filamentos de actina neuronal los cuales, en efecto, contribuyen a la neurodegeneración tipo Alzheimer en modelos murinos. Considerando estos antecedentes, los resultados sugieren que las alteraciones morfológicas en el citoesqueleto de actina observadas sobre las neuronas pueden ser causadas por la proteína tau agregada presente en el medio condicionado de la microglía, que sería capaz de inducir el plegamiento anormal de la proteína tau intracelular (Frost et al., 2009). La asociación de esta tau libre dentro del sistema con polímeros de actina puede ser responsable de su disminuida actividad de promover el ensamblaje de microtúbulos. Sin embargo, dado que esta proteína inocua se encuentra naturalmente

desplegada, es posible que su interacción con actina afecte la estabilidad de esta unión consecuentemente con la disrupción de la red citoesquelética, complementando el efecto con las citoquinas pro-inflamatorias como mediador de neurotoxicidad descritas para la EA y otros desordenes relacionados, un tema que merece futuras investigaciones para ser dilucidado.

Efectos de medios condicionados de microglías sobre morfología en neuronas hipocampales de rata.

El protocolo utilizado para la obtención de neuronas hipocampales provee cultivos de baja densidad, usando medio Neurobasal/B27 como sustrato óptimo para la sobrevivencia de las neuronas a largo plazo (Brewer et al., 1993). Los cambios morfológicos de las neuronas fueron evaluados tras 24 horas de exposición al medio condicionado de microglías activadas con htau40 agregada, período suficiente para la aparición de neuritas que fueron medidas y contadas (Kaech & Banker, 2006). Las neuronas expuestas a las mayores concentraciones de htau agregada (Figuras 9C y D) vieron reducida la longitud de sus neuritas frente a las neuronas control (Figura 10D y E). Basándose en la evidencia proporcionada por Fulga y colaboradores (Fulga et al., 2007), los resultados sugieren que tau agregada inhibe la polimerización o bien desorganiza la red citoesquelética de actina neuronal, afectando la extensión de las proyecciones neuríticas y transformando a las neuronas en células con fenotipo neurodegenerativo

(Coles & Bradke, 2015) coherente con las funciones que cumple la actina en el crecimiento de neuritas y estabilización de estructuras sinápticas (Dent & Gertler, 2003) (Xu et al., 2013).

Bajo la misma condición experimental, no se observaron cambios en la cantidad de neuritas presentes en cada célula. Aunque LPS y tau agregada mostraron afectar la estabilidad del citoesqueleto de actina en las neuronas, es posible que no ejerzan una función tóxica sobre la red de actina que participa en los procesos de desarrollo y crecimiento de neuritas, proceso denominado neuritogénesis (Da Silva & Dotti, 2002).

CONCLUSIÓN

La estrategia experimental de esta tesis nos llevó a obtener valiosa información que apoya nuestra hipótesis de la Neuroinmunomodulación. Los resultados mostraron experimentalmente que la activación de células de la microglía por tau humana agregada como "señal de daño", promueve una serie de eventos que involucran alteraciones morfológicas en su citoesqueleto de actina, que modifican el fenotipo fagocítico a uno ameboides, junto con la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF α e IL-6, y la producción de óxido nítrico (NO). Esta respuesta inmune es significativa a la mayor concentración de tau agregada (50 μ g/ml), atribuyéndole una ganancia tóxica de función como agregado y en alta concentración. Además la exposición de estos agregados a neuronas hipocampales, afectaron la morfología neuronal, acortando la longitud de los procesos neuríticos sin modificar la cantidad de neuritas sugiriendo que tau agregada resulta tóxica para el crecimiento de neuritas y su diferenciación.

Los resultados fueron consistentes y se ajustaron al modelo propuesto en la hipótesis que sustenta esta tesis, constituyendo los eventos iniciales en la cascada neurodegenerativa. Como se ha mencionado esta cascada pro-inflamatoria lleva finalmente a la activación de cdk5 y gsk3B, con la consecuente hiperfosforilación de tau y su agregación patológica en oligómeros y filamentos anómalos como los encontrados en la EA. Esto puede ser explicado también por la estimulación de la vía de señalización inducida por las citoquinas pro-inflamatorias (IL-6 y TNF α) sobre las células neuronales, con la consecuente disrupción de la dinámica del citoesqueleto de actina, debido a sitios específicos de la proteína tau propensos a la agregación.

Los efectos de la sobre activación de la microglía en este modelo experimental se resumen en el exceso de secreción de citoquinas pro-inflamatorias, cuya acción sobre las neuronas sería alterar patológicamente la regulación de la citoestructura intraneuronal. Estos cambios llevarían a las alteraciones en la proteína tau involucradas en la patogénesis de los procesos neurodegenerativos del tipo Alzheimer.

Finalmente, esta tesis pretende aportar con nuevos datos que permitan dilucidar los mecanismos en torno a esta activación y los efectos de oligómeros y/o filamentos de tau sobre el proceso neurodegenerativo.

Agradecimientos: Esta tesis ha sido financiada por el proyecto FONDECYT 1110373 (a RBM), CORFO 14IEAT-28658 y por el Centro Internacional de Biomedicina ICC.

BIBLIOGRAFÍA

- Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G. M., Cooper, N. R., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B. L., Finch, C. E., Frautschy, S., Griffin, W. S., Hampel, H., Hull, M., Landreth, G., Lue, L., Mrak, R., Mackenzie, I. R., McGeer, P. L., O'Banion, M. K., Pachter, J., Pasinetti, G., Plata-Salaman, C., Rogers, J., Rydel, R., Shen, Y., Streit, W., Strohmeyer, R., Tooyoma, I., Van Muiswinkel, F. L., Veerhuis, R., Walker, D., Webster, S., Wegrzyniak, B., Wenk, G. & Wyss-Coray, T. 2000. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **21**: 383-421.
- Alvarez, A., Munoz, J. P. & Maccioni, R. B. 2001. A Cdk5-p35 stable complex is involved in the beta-amyloid-induced deregulation of Cdk5 activity in hippocampal neurons. *Exp Cell Res* **264**: 266-74.
- Alvarez, A., Toro, R., Caceres, A. & Maccioni, R. B. 1999a. Inhibition of tau phosphorylating protein kinase cdk5 prevents beta-amyloid-induced neuronal death. *FEBS Lett* **459**: 421-6.
- Alvarez, G., Munoz-Montano, J. R., Satrustegui, J., Avila, J., Bogonez, E. & Diaz-Nido, J. 1999b. Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Lett* **453**: 260-4.
- Allan, S. M. & Rothwell, N. J. 2001. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* **2**: 734-44.
- Arai, K. I., Lee, F., Miyajima, A., Miyatake, S., Arai, N. & Yokota, T. 1990. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem* **59**: 783-836.
- Arnett, H. A., Mason, J., Marino, M., Suzuki, K., Matsushima, G. K. & Ting, J. P. 2001. TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* **4**: 1116-22.
- Ballatore, C., Lee, V. M. & Trojanowski, J. Q. 2007. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* **8**: 663-72.
- Barghorn, S., Biernat, J. & Mandelkow, E. 2005. Purification of recombinant tau protein and preparation of Alzheimer-paired helical filaments in vitro. *Methods Mol Biol* **299**: 35-51.
- Brewer, G. J., Torricelli, J. R., Evege, E. K. & Price, P. J. 1993. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res* **35**: 567-76.
- Brown, G. C. & Bal-Price, A. 2003. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. *Mol Neurobiol* **27**: 325-55.

- Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A. & Hof, P. R. 2000. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* **33**: 95-130.
- Coles, C. H. & Bradke, F. 2015. Coordinating Neuronal Actin-Microtubule Dynamics. *Curr Biol* **25**: R677-91.
- Correa, G. & Longart, M. 2010. Análisis morfométrico del proceso de diferenciación in vitro de neuronas del hipocampo. *Investigación Clínica* **51**: 501 - 518.
- Covacu, R., Arvidsson, L., Andersson, A., Khademi, M., Erlandsson-Harris, H., Harris, R. A., Svensson, M. A., Olsson, T. & Brundin, L. 2009. TLR activation induces TNF-alpha production from adult neural stem/progenitor cells. *J Immunol* **182**: 6889-95.
- Cross, D., Vial, C. & Maccioni, R. B. 1993. A tau-like protein interacts with stress fibers and microtubules in human and rodent cultured cell lines. *J Cell Sci* **105 (Pt 1)**: 51-60.
- Da Silva, J. S. & Dotti, C. G. 2002. Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nat Rev Neurosci* **3**: 694-704.
- Dent, E. W. & Gertler, F. B. 2003. Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* **40**: 209-27.
- Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., Dekosky, S. T., Barberger-Gateau, P., Cummings, J., Delacourte, A., Galasko, D., Gauthier, S., Jicha, G., Meguro, K., O'Brien, J., Pasquier, F., Robert, P., Rossor, M., Salloway, S., Stern, Y., Visser, P. J. & Scheltens, P. 2007. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol* **6**: 734-46.
- Farias, G., Cornejo, A., Jimenez, J., Guzman, L. & Maccioni, R. B. 2011. Mechanisms of tau self-aggregation and neurotoxicity. *Curr Alzheimer Res* **8**: 608-14.
- Farias, G. A., Guzman-Martinez, L., Delgado, C. & Maccioni, R. B. 2014. Nutraceuticals: a novel concept in prevention and treatment of Alzheimer's disease and related disorders. *J Alzheimers Dis* **42**: 357-67.
- Farias, G. A., Munoz, J. P., Garrido, J. & Maccioni, R. B. 2002. Tubulin, actin, and tau protein interactions and the study of their macromolecular assemblies. *J Cell Biochem* **85**: 315-24.
- Fernandez, J. A., Rojo, L., Kuljis, R. O. & Maccioni, R. B. 2008. The damage signals hypothesis of Alzheimer's disease pathogenesis. *J Alzheimers Dis* **14**: 329-33.
- Frei, K., Malipiero, U. V., Leist, T. P., Zinkernagel, R. M., Schwab, M. E. & Fontana, A. 1989. On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. *Eur J Immunol* **19**: 689-94.
- Frost, B., Jacks, R. L. & Diamond, M. I. 2009. Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem* **284**: 12845-52.
- Fulga, T. A., Elson-Schwab, I., Khurana, V., Steinhilb, M. L., Spires, T. L., Hyman, B. T. & Feany, M. B. 2007. Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nat Cell Biol* **9**: 139-48.
- Gadient, R. A. & Otten, U. H. 1997. Interleukin-6 (IL-6)--a molecule with both beneficial and destructive potentials. *Prog Neurobiol* **52**: 379-90.
- Gardoni, F., Boraso, M., Zianni, E., Corsini, E., Galli, C. L., Cattabeni, F., Marinovich, M., Di Luca, M. & Viviani, B. 2011. Distribution of interleukin-1 receptor complex at the synaptic membrane driven by interleukin-1beta and NMDA stimulation. *J Neuroinflammation* **8**: 14.

- Gomez-Ramos, A., Diaz-Hernandez, M., Cuadros, R., Hernandez, F. & Avila, J. 2006. Extracellular tau is toxic to neuronal cells. *FEBS Lett* **580**: 4842-50.
- Hanisch, U. K. 2002. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* **40**: 140-55.
- Henriquez, J. P., Cross, D., Vial, C. & Maccioni, R. B. 1995. Subpopulations of tau interact with microtubules and actin filaments in various cell types. *Cell Biochem Funct* **13**: 239-50.
- Hirsch, E. C. & Hunot, S. 2009. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol* **8**: 382-97.
- Ihara, Y., Nukina, N., Miura, R. & Ogawara, M. 1986. Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J Biochem* **99**: 1807-10.
- Jenkins, S. M., Zinnerman, M., Garner, C. & Johnson, G. V. 2000. Modulation of tau phosphorylation and intracellular localization by cellular stress. *Biochem J* **345 Pt 2**: 263-70.
- Kaech, S. & Banker, G. 2006. Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc* **1**: 2406-15.
- Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M. & Verkhratsky, A. 2011. Physiology of microglia. *Physiol Rev* **91**: 461-553.
- Kitazawa, M., Cheng, D., Tsukamoto, M. R., Koike, M. A., Wes, P. D., Vasilevko, V., Cribbs, D. H. & LaFerla, F. M. 2011. Blocking IL-1 signaling rescues cognition, attenuates tau pathology, and restores neuronal beta-catenin pathway function in an Alzheimer's disease model. *J Immunol* **187**: 6539-49.
- Kovac, A., Zilka, N., Kazmerova, Z., Cente, M., Zilkova, M. & Novak, M. 2011. Misfolded truncated protein tau induces innate immune response via MAPK pathway. *J Immunol* **187**: 2732-9.
- Lieb, K., Engels, S. & Fiebich, B. L. 2003. Inhibition of LPS-induced iNOS and NO synthesis in primary rat microglial cells. *Neurochem Int* **42**: 131-7.
- Lue, L. F., Brachova, L., Walker, D. G. & Rogers, J. 1996. Characterization of glial cultures from rapid autopsies of Alzheimer's and control patients. *Neurobiol Aging* **17**: 421-9.
- Maccioni, R. B. 2011. Tau protein in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* **8**: 607.
- Maccioni, R. B. & Cambiazo, V. 1995. Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol Rev* **75**: 835-64.
- Maccioni, R. B., Farias, G., Morales, I. & Navarrete, L. 2010. The revitalized tau hypothesis on Alzheimer's disease. *Arch Med Res* **41**: 226-31.
- Maccioni, R. B., Otth, C., Concha, I. & Munoz, J. P. 2001. The protein kinase Cdk5. Structural aspects, roles in neurogenesis and involvement in Alzheimer's pathology. *Eur J Biochem* **268**: 1518-27.
- Maccioni, R. B. & Perry, G. 2009. *Current Hypotheses and Research Milestones in Alzheimer's Disease*. Springer Science+Business Media, LLC, New York.
- Maccioni, R. B., Rojo, L. E., Fernandez, J. A. & Kuljis, R. O. 2009. The role of neuroimmunomodulation in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* **1153**: 240-6.
- Majerova, P., Zilkova, M., Kazmerova, Z., Kovac, A., Paholikova, K., Kovacech, B., Zilka, N. & Novak, M. 2014. Microglia display modest phagocytic capacity for extracellular tau oligomers. *J Neuroinflammation* **11**: 161.
- Mandelkow, E. M. & Mandelkow, E. 2012. Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**: a006247.
- Marcus, J. S., Karackattu, S. L., Fleegal, M. A. & Summers, C. 2003. Cytokine-stimulated inducible nitric oxide synthase expression in astroglia: role of Erk mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB. *Glia* **41**: 152-60.

- McGeer, P. L., Rogers, J. & McGeer, E. G. 2006. Inflammation, anti-inflammatory agents and Alzheimer disease: the last 12 years. *J Alzheimers Dis* **9**: 271-6.
- Moncada, S. & Higgs, A. 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* **329**: 2002-12.
- Morales, I., Farias, G. & Maccioni, R. B. 2010. Neuroimmunomodulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuroimmunomodulation* **17**: 202-4.
- Morales, I., Jimenez, J. M., Mancilla, M. & Maccioni, R. B. 2013. Tau oligomers and fibrils induce activation of microglial cells. *J Alzheimers Dis* **37**: 849-56.
- Morris, M., Maeda, S., Vossel, K. & Mucke, L. 2011. The many faces of tau. *Neuron* **70**: 410-26.
- Ni, M. & Aschner, M. 2010. Neonatal rat primary microglia: isolation, culturing, and selected applications. *Curr Protoc Toxicol* **Chapter 12**: Unit 12 17.
- Nikolic, M., Dudek, H., Kwon, Y. T., Ramos, Y. F. & Tsai, L. H. 1996. The cdk5/p35 kinase is essential for neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Genes Dev* **10**: 816-25.
- Orellana, D. I., Quintanilla, R. A., Gonzalez-Billault, C. & Maccioni, R. B. 2005. Role of the JAKs/STATs pathway in the intracellular calcium changes induced by interleukin-6 in hippocampal neurons. *Neurotox Res* **8**: 295-304.
- Orellana, D. I., Quintanilla, R. A. & Maccioni, R. B. 2007. Neuroprotective effect of TNFalpha against the beta-amyloid neurotoxicity mediated by CDK5 kinase. *Biochim Biophys Acta* **1773**: 254-63.
- Quintanilla, R. A., Orellana, D. I., Gonzalez-Billault, C. & Maccioni, R. B. 2004. Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway. *Exp Cell Res* **295**: 245-57.
- Raivich, G., Jones, L. L., Werner, A., Bluthmann, H., Doetschmann, T. & Kreutzberg, G. W. 1999. Molecular signals for glial activation: pro- and anti-inflammatory cytokines in the injured brain. *Acta Neurochir Suppl* **73**: 21-30.
- Ramirez, G., Toro, R., Dobeli, H. & von Bernhardi, R. 2005. Protection of rat primary hippocampal cultures from A beta cytotoxicity by pro-inflammatory molecules is mediated by astrocytes. *Neurobiol Dis* **19**: 243-54.
- Rojo, L. E., Fernandez, J. A., Maccioni, A. A., Jimenez, J. M. & Maccioni, R. B. 2008. Neuroinflammation: implications for the pathogenesis and molecular diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Med Res* **39**: 1-16.
- Selenica, M. L., Davtyan, H., Housley, S. B., Blair, L. J., Gillies, A., Nordhues, B. A., Zhang, B., Liu, J., Gestwicki, J. E., Lee, D. C., Gordon, M. N., Morgan, D. & Dickey, C. A. 2014. Epitope analysis following active immunization with tau proteins reveals immunogens implicated in tau pathogenesis. *J Neuroinflammation* **11**: 152.
- Serou, M. J., DeCoster, M. A. & Bazan, N. G. 1999. Interleukin-1 beta activates expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in primary hippocampal neuronal culture: platelet-activating factor as a preferential mediator of cyclooxygenase-2 expression. *J Neurosci Res* **58**: 593-8.
- Spittaels, K., Van den Haute, C., Van Dorpe, J., Bruynseels, K., Vandezande, K., Laenen, I., Geerts, H., Mercken, M., Sciot, R., Van Lommel, A., Loos, R. & Van Leuven, F. 1999. Prominent axonopathy in the brain and spinal cord of transgenic mice overexpressing four-repeat human tau protein. *Am J Pathol* **155**: 2153-65.
- Uhlemann, R., Gertz, K., Boehmerle, W., Schwarz, T., Nolte, C., Freyer, D., Kettenmann, H., Endres, M. & Kronenberg, G. 2015. Actin dynamics shape microglia effector functions. *Brain Struct Funct.*

- Vallieres, L. & Rivest, S. 1997. Regulation of the genes encoding interleukin-6, its receptor, and gp130 in the rat brain in response to the immune activator lipopolysaccharide and the proinflammatory cytokine interleukin-1beta. *J Neurochem* **69**: 1668-83.
- Van Rossum, D. & Hanisch, U. K. 2004. Microglia. *Metab Brain Dis* **19**: 393-411.
- Van Wagoner, N. J. & Benveniste, E. N. 1999. Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. *J Neuroimmunol* **100**: 124-39.
- Vitkovic, L., Bockaert, J. & Jacque, C. 2000. "Inflammatory" cytokines: neuromodulators in normal brain? *J Neurochem* **74**: 457-71.
- Von Bernhardi, R. 2007. Glial cell dysregulation: a new perspective on Alzheimer disease. *Neurotox Res* **12**: 215-32.
- Xu, K., Zhong, G. & Zhuang, X. 2013. Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons. *Science* **339**: 452-6.
- Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S. M., Iwata, N., Saido, T. C., Maeda, J., Suhara, T., Trojanowski, J. Q. & Lee, V. M. 2007. Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* **53**: 337-51.