

UCH-FC  
Biotecnología  
M&B  
C1

UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO



# **“Pruebas Experimentales sobre la Hipótesis de la Neuroinmunomodulación en la Neurodegeneración del tipo Alzheimer”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

**INELIA MORALES GONZÁLEZ**



Director de Seminario de Título: Dr. Ricardo B. Maccioni

Julio 2010  
Santiago – Chile



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta. **Inelia Morales González**,

### “PRUEBAS EXPERIMENTALES SOBRE LA HIPÓTESIS DE LA NEUROINMUNOMODULACIÓN EN LA NEURODEGENERACIÓN DEL TIPO ALZHEIMER”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

*Dr. Ricardo B. Macconi*

**Director Seminario de Título**

### Comisión de Evaluación

*Dr. Julio Alcayaga*

**Presidente Comisión**

*Dr. Patricio Fuentes*

**Evaluador**

Santiago de Chile,

23/07/2010



## BIOGRAFIA



Nací en Santiago de Chile, el 3 de marzo de 1984, en el seno de una cariñosa familia. Soy la menor de 2 hijos, mi padre es el mayor de 6 hermanos y mi madre la menor de otros 13. Siendo muy pequeña nos fuimos a vivir por casi 2 años a Princeton, New Jersey (E.E.U.U.), por motivos académicos de mi padre, de lo cual solo guardo escasos recuerdos y muchas fotografías que ayudan a la memoria. Volvimos a Chile cuando yo cumplía los 4 años y en ese momento comenzó la vida colegial. El desarrollo básico intelectual fue entregado por un mágico colegio, del cual recuerdo principalmente la enseñanza de valores, principios y la entrega de cultura, mas allá de las sumas y restas, de la gramática e historia, materias que sin darme cuenta fueron igual incorporadas en mi mientras jugaba o

sembraba la tierra. Este colegio me albergó hasta sexto año y en el conocí a personas extraordinarias con las cuales se mantienen esos maravillosos lazos creados en la infancia. El Florence es una gran familia, a la que estoy muy agradecida de haber llegado.

De pequeña gracias al esfuerzo de mis padres y en especial de mi madre, me vi llena de cultura, llena de música y danza. Así fue como aprendí a tocar piano y de esta forma logre entender de forma muy básica el lenguaje universal de la música, que para esas fechas mi hermano ya comenzaba dominar. Posteriormente deje el piano, pero nunca olvide la lectura de las notas y mi hermano se encargó de que nunca olvidara el sonido del piano.

En 1996 entré a colegio Carmela Carvajal de Prat, donde desapareció la mágica enseñanza de la básica, pero comenzó el encuentro con el mundo real, ahí aprendí muchas realidades de vida distintas de la mía, aprendí del estudio y que la constancia es lo que hace el aprendizaje, del esfuerzo por ser mejor y del trabajo que eso significa.

Dada la profesión de mis padres siempre estuve ligada a la Universidad de Chile, particularmente a la Facultad de Ciencias, algunos de sus académicos y funcionarios estuvieron cercanos a mi grupo familiar y fueron espectadores de como mi hermano y yo crecíamos, pasando de ser inquietos pero respetuosos niños en jóvenes con grandes aspiraciones. Así fue como en el año 2002 ingrese por P.A.A. al la Universidad de Chile al programa académico de Bachillerato. Ubicado en el complejo campus Juan Gomez Millas, en medio de la Facultad de Ciencias, el bachi se convirtió en el mundo multidisciplinario, donde conocí de ciencias básicas y de ciencias sociales, de filosofía y de la maravillosa historia contada por el profe Ítalo. Aquí también conocí de amistad y mala competencia, donde gracias a la sólida formación que se me entrego supe elegir bien y dan cuenta de ello quienes hasta el día de hoy son mis amigos.

En 2003 comenzó la aventura en la Facultad de Ciencias, aventura que se me complico mas de lo que esperaba, pero nunca fue mayor que mi voluntad de seguir adelante. Al ser una estudiante de la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular me encontré rodeada de

gente conocida, de muchos profes que conocían a mi familia, de colegas de mi padre y excolegas de mi madre que me hicieron sentir su apoyo y la alegría de verme ahí. En el transcurso de la carrera pude participar de forma experimental en el laboratorio de Neurociencias, en el de Bioquímica y el de Genética, desarrollando pasantías y unidades de investigación que aportaron mucho a mi vida académica, y en los dos últimos casos también aportaron una rica interacción social haciendo en cada lugar grandes amigos.

En mitad de los estudios nació en mi una nueva inquietud, una forma de expresión diferente, dada por la música, el canto y baile, y me llené de flamenco. Aun que es difícil expresarse en el movimiento yo sigo intentando querer hacerlo, y la falta de esto se vuelve necesidad con el tiempo.

Finalmente en 2008 me incorporé al laboratorio de Biología Celular, Molecular y Neurociencias, donde decidí realizar mi seminario de título ya que sus estudios enfocados en la enfermedad de Alzheimer son para mi una gran motivación para trabajar en pos de buscar un bien social.



## DEDICATORIA



A mi Padre, que es el ejemplo,  
A Orión, que es la dedicación y el esfuerzo,  
y en especial a ti Mamá...  
por ser el Pilar inquebrantable y el motor de mi vida.



## AGRADECIMIENTOS

El logro de llegar a esta etapa tan importante sin duda que es el resultado de un esfuerzo personal, pero que nunca lo hubiese podido lograr sin el incondicional apoyo de mi familia: mis padres y hermano. A Raúl y Cecilia del Pilar, por ser padres amorosos y generosos, por llenar mi vida de valores y principios, siendo ellos el vivo ejemplo de cada una de sus enseñanzas. A Orión por trabajar hasta lograr convertir el ruido en melodía y las tormentas en música, por plasmar sus pensamientos, sueños y sentimientos en el idioma universal que traspasa las fronteras del tiempo.

A mis queridas amigas Palomí, Javi y Kathy, por acompañarme en todos los momentos de la vida, los malos, los buenos y los muy buenos. Gracias por enseñarme todos los días que la amistad que proyectamos vestidas de jumper se hace realidad en base a la confianza, al apoyo y al cariño. A Evita por ser un pilar para quienes la rodean y no descansar, gracias por ser mi ejemplo de fortaleza y por brindarme estos lindos años de amistad, y a la linda Carlota por llenarnos con su alegría, por traer consigo el regalo de la vida y seguir adelante.

A Sandra, Sofía, Bárbara, Gabriel, Luke y Phillip quienes conocí en Bachillerato al entrar en la universidad y se convirtieron en mis amigos con quienes tengo el placer de seguir compartiendo el crecer y concretar nuevas etapas en nuestras vidas. A la Coni por los lindos momentos y todos esos motivos de risas que quedan guardados en la memoria.

A los bachitecs, por que con ellos compartí la desconocida aventura de la biotecnología, especialmente a Cecilia, por ser mi amiga y compañera perfecta de trabajos, un ejemplo de rigurosidad y responsabilidad, y por hacerme sentir su apoyo en todo momento.

A los biotecs, a la Pau y a la Dany, por ser tan distintas y claras en enseñarme sus opiniones y puntos de vista, por mostrarme la belleza de la diversidad. A Gabriel, por ser mi partner no solo en los estudios, por tener siempre una opinión distinta a la mía cuando hay que estudiar o cuando hacíamos un trabajo. A la linda Nelly por todas las tardes estudiando micro, por hacerme cantar en la biblioteca, por todas esas conversaciones con un té en la mano y por los sueños que compartimos y que sé que los cumplirá. A Cinthia por ayudarme a estudiar y a entender, por todas las noches que con la Solè pasamos en su casa estudiando, por la paciencia para explicarme y por mostrarme como hacer mas entretenido el pictograma. A Fabiola, por abrirme las puertas de su casa en el sur, por que cada día la confianza es mayor y podemos disfrutar de la amistad.

También agradezco a quienes me recibieron y compartieron mi estadía en el lab de Genética, a todos los chicos del lab por ser alegres y buena onda, especialmente a Dony por ser siempre muy cariñosa. A todos los que conforman el lab de Bioquímica y que compartieron conmigo lindos momentos y tardes de trabajo, como olvidar las navidades de bioquímica. A Claudia, la Bellota, por ser mi amiga, por estar siempre dispuesta a ayudar, por ser un ejemplo de fuerza y esfuerzo, por ser alegre, tierna y cariñosa.

Al profe Maccioni por su apoyo y confianza, a mis compañeros del lab, a Leo pela'o, Pato, Leito, Gonzalo, Alberto, Charlie, Andreas y José por aperrar y trabajar a pesar de las dificultades, por poner el hombro y seguir adelante. A Juan Carlos por ser siempre el



primer saludo para comenzar el día al llegar al milenio, a Carlitos por inyectarme de ánimo y cariño con su abrazo, a Margarita y a don Juan por su cariño y amabilidad, y a Cristina, la vecina, por estar siempre ahí para socorrerme en el lab y ayudarme en todo lo que necesite.

A Juan Camilo, Diego e Ignacio, por que más que ser mi grupo de estudio son mis amigos, por todas las veces que nos juntamos ya sea los 4, los 3 o los 2 y por compartir tan buenos momentos, ya sea con un cuaderno, una prueba o una pifia colada. Gracias por su franqueza, confianza y apoyo. Y bueno, gracias Chilo por tu inagotable energía y por mostrarme el reggaeton, y hacer que me guste.

A Ricardo por ser mi guía, por tener siempre el consejo preciso y la experiencia necesaria para orientarme, por darse un tiempo en la vorágine de sus actividades para escucharme y atender a mis inquietudes, no sólo académicas sino filosóficas y de vida, por mostrarme lo que es estar maravillado de las ciencias y vivir la emoción con cada cosa que hace.

Finalmente a Miguel, por que es quien me alienta y me apoya, quien me critica y exige, quien me abraza y me anima. Por que me llena con su optimismo y esfuerzo, invitándome a ser mejor cada día. Por que en su música refleja sus sentimientos y pensamientos motivándome a seguir en mis proyectos, así como él lo hace. Gracias por el cariño y el amor que me entregas, por tus sonidos y tus silencios, y simplemente por estar junto a mí.





## Índice de contenidos

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Exposición general del problema y fundamentación teórica.....	1
1.2 Hipótesis para este Seminario de Título.....	9
1.3 Objetivos.....	9
1.3.1 Objetivo General.....	9
1.3.2 Objetivos específicos.....	9
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	10
2.1 Materiales.....	10
2.1.1 Reactivos Generales.....	10
2.1.2 Reactivos para la purificación de proteína tau.....	10
2.1.3 Materiales para la purificación de proteína tau.....	10
2.1.4 Reactivos esenciales para el Cultivo Celular .....	11
2.1.5 Reactivos para Cultivo Primario.....	11
2.1.6 Materiales de Cultivo.....	11
2.1.7 Anticuerpos .....	11
2.1.8 Equipos utilizados .....	12
2.2 Métodos.....	12
2.2.1 Purificación de proteína tau .....	12
2.2.2 Agregación de tau.....	13
2.2.3 Cultivo Primario.....	14
2.2.4 Cultivo de Microglía.....	15
2.2.5 Exposición de Microglías a Peróxido.....	15





2.2.6 Exposición de microglías a proteína tau.....	17
2.2.7 Medición de Nitritos.....	17
2.2.8 Inmunofluorescencia .....	18
2.2.9 Análisis estadístico .....	18
3. RESULTADOS .....	19
3.1 Obtención de cultivo primario extraído de corteza completa de rata neonata.....	19
3.2 Aislamiento de microglías desde cultivo primario de corteza.....	20
3.3 Exposición de cultivos microgliales a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y determinación de la activación microglial.....	21
3.3.1 Resultados de la determinación de nitritos.....	21
3.3.2 Inmunofluorescencia de células microgliales en exposición a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	23
3.4 Purificación de proteína tau a partir de cerebro de bovino.....	25
3.5 Ensayos de agregación de proteína tau.....	26
3.6 Exposición de cultivos microgliales a proteína tau y determinación de la activación microglial.....	26
3.6.1 Determinación de nitritos en exposición a proteína tau monomérica.....	26
3.6.2 Determinación de nitritos luego de exposición a proteína tau agregada.....	28
3.6.3 Inmunofluorescencia de células microgliales expuestas a proteína tau agregada.....	31
4. DISCUSIÓN.....	33
4.1 Cultivo de microglías.....	33
4.2 Efecto del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en células microgliales.....	34
4.3 Purificación y agregación de proteína tau.....	35
4.4 Efecto de la proteína tau en células microgliales.....	35

4.4.1 Proteína tau monomérica.....	36
4.4.2 Proteína tau agregada.....	37
5. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES.....	39
6. BIBLIOGRAFÍA .....	43
7. ANEXOS.....	47





## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Extracto reproducido del paper de Kettenmann, 2006.....	4
<b>Figura 2.</b> Hipótesis neuroinmunomoduladora de la EA.....	8
<b>Figura 3.</b> Ejemplo gráfico de cultivo microglial en placas de 96 pocillos.....	16
<b>Figura 4.</b> Cultivo primario de corteza de 10 días.....	19
<b>Figura 5.</b> Cultivo de microglías no activadas con 48 horas de reposo.....	21
<b>Figura 6.</b> Determinación de nitritos en el medio extracelular de células expuestas a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	22
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de activación microglial.....	23
<b>Figura 8.</b> Inmunofluorescencia de cultivos microgliales expuestos a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	24
<b>Figura 9.</b> Purificación de proteína tau bovina.....	25
<b>Figura 10.</b> Determinación de nitritos en el medio extracelular de células expuestas a tau monomérica.....	27
<b>Figura 11.</b> Porcentaje de activación microglial.....	28
<b>Figura 12.</b> Determinación de nitritos en el medio extracelular de células expuestas a tau agregada.....	30
<b>Figura 13.</b> Porcentaje de activación microglial.....	30
<b>Figura 14.</b> Inmunofluorescencia de cultivos microgliales expuestos a proteína tau agregada.....	32
<b>Figura 15.</b> Modelo de activación microglial conducente a neurodegeneración.....	42

## Lista de abreviaturas

AGEs : Productos de Glicación Avanzada

A $\beta$  :  $\beta$ -amiloide

Der : derecha

EA (AD) : Enfermedad de Alzheimer

Etc : etcétera

GTP : Guanosín Trifosfato

HMBG1 : high-mobility group box 1

IL-1 $\beta$  : Interleuquina 1 $\beta$

IL-6 : Interleuquina 6

Izq : izquierda

LPS : Lipopolisacárido

MHCII : Complejo de Histocompatibilidad Mayor II

NF $\kappa$ - $\beta$  : Factor Nuclear kappa  $\beta$

NO : Oxido Nítrico

NSAIDs : Drogas Anti-Inflamatorias No Esteroidales

NTFs : Ovillos Neurofibrilares

oxLDL : Lipoproteína Oxidada de Baja Densidad

PHFs : Filamentos Helicoidales Pareados

PPRs : Receptores de Reconocimiento de Patrones

ROS : Especies Reactivas de Oxígeno

SNC : Sistema Nervioso Central

TLRs : Receptor de Tipo Toll

TNF- $\alpha$  : Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$

## RESUMEN

El mal de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa del cerebro, es la causa más frecuente de demencia que afecta a los adultos mayores. En etapas avanzadas la enfermedad de Alzheimer (EA) produce la muerte masiva de neuronas, lo que finalmente se ve reflejado en cambios intensos que afectan la plasticidad neuronal, la memoria y el aprendizaje. En la actualidad se estima que cerca de un 10% de la población mayor de 65 años se ve afectado con la enfermedad y su incidencia se duplica cada 5 años a partir de la misma edad, por lo que la EA aumenta en la medida que la población envejece.

En el año 2008 investigadores de nuestro laboratorio plantearon una teoría unificadora del Alzheimer, basada en la activación a largo plazo del sistema inmune innato por un conjunto particular de alteraciones que son capaces de desencadenar una cascada anómala de señalizaciones, tales como agregación de la proteína tau y formación de filamentos helicoidales pareados, los que a su vez convergen en un final común: el desarrollo de la EA. Esta teoría neuroinmunomoduladora, como hipótesis central de la EA, integra los diferentes factores de riesgo que afectan a las células gliales, las alteraciones neuronales resultantes producto de la exposición a señales de daño y la hiperfosforilación de la proteína tau.

Una amplia variedad de estudios han demostrado que las células microgliales tienen un papel fundamental en el sistema inmune innato del sistema nervioso, en donde la activación por diferentes eventos de estrés las llevan a una sobreproducción de citoquinas proinflamatorias que gatillan patrones alterados de señalización que conducen finalmente a la neurodegeneración. Esta activación celular se ha transformado en un punto clave de la formulación de la presente hipótesis de la EA. De ahí que, en este Seminario de Título se ha estudiado la activación de la microglia por efecto de exposición a señales de daño del tipo estrés oxidativo y del tipo proteína tau. Los resultados que hemos obtenido frente al estímulo del tipo estrés oxidativo en los cultivos microgliales evidenciaron una clara activación celular, que resultó ser proporcional al aumento del agente de estrés oxidativo. Por otra parte, los resultados provenientes de exponer las microglías a proteína tau monomérica no nos permitieron evidenciar un efecto activador. Sin embargo, en el caso de la proteína tau agregada hemos evidenciado su papel de agente activador de la microglia,

activación que también resulta ser proporcional a la concentración de proteína tau agregada a la que fueron expuestos los cultivos.

Finalmente, los resultados obtenidos en el presente trabajo nos han permitido presentar los primeros antecedentes experimentales de la validación de la hipótesis planteada, en una nueva perspectiva interpretativa del desarrollo temprano de la EA, abriendo nuevas expectativas en la búsqueda de posibles tratamientos o formas de prevención de esta enfermedad.

## ABSTRACT

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disease of the brain, the most common cause of dementia affecting seniors. Advanced stages of Alzheimer's disease (AD) cause the massive death of neurons, which ultimately is reflected in intense changes that affect neuronal plasticity, memory and learning. Currently it is estimated that about 10% of the population over 65 years old is affected with the disease and its incidence doubles every five years from the same age, so the EA increases as the population ages.

In the year 2008, researchers from our laboratory raised a unifying theory of AD, based on long-term activation of the innate immune system by a particular set of changes that are capable of triggering a cascade of abnormal signs, such as tau protein aggregation and formation of paired helical filaments, which in turn converges to a common end: the development of AD. This neuroimmunomodulating theory, as central hypothesis of AD, integrates the various risk factors affecting glial cells, neuronal alterations resulting from exposure to signs of damage and hyperphosphorylation of tau protein.

A wide variety of studies have shown that microglial cells have a key role in the innate immune system of nervous system, where activation by different stress events lead to the overproduction of proinflammatory cytokines that trigger signaled altered patterns which ultimately leads to neurodegeneration. This cell activation has become a key point in the formulation of this hypothesis EA. Hence, this Seminar Title has studied the activation of microglia by the effect of exposure to damage signals such as oxidative stress and tau protein. The results we have obtained against oxidative stress stimulus type in microglial cultures clearly showed cell activation, which turned out to be proportional to the increase of oxidative stress agent. Moreover, results from cultures of microglia exposed to monomeric tau protein don't allow us to show an effect on activator, however, in the case of aggregated tau protein we have confirmed its role as a microglia activator. Activation that is also proportional to the increase in tau protein concentration added to the cellular cultures.

Finally, the results obtained in this work have allowed us to present the first experimental background of hypothesis validation, in a new interpretative perspective of



the early AD development, opening new expectations in the search for possible treatments or ways of preventing this disease.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Exposición general del problema y fundamentación teórica

### La enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia en los adultos mayores de nuestra época, lo que se ha asociado principalmente al aumento en las expectativas de vida y longevidad de las personas. Estudios recientes demuestran que sobre el 10% de la población mayor de 65 años se ve afectada por esta enfermedad, pudiendo aumentar a más del 20% en la población de 80 años (Hanger y col, 2009), y es capaz de alcanzar una prevalencia del 50% en los segmentos etáreos mayores de 85 años (Blennow y col, 2006). En este contexto, la edad es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la EA. En EE.UU. donde existen más de 5.500.000 de pacientes con demencia, alrededor del 70% del total de los casos de demencia en personas que superan los 71 años son de tipo EA (Alzheimer's Association, 2009), mientras que la realidad nacional indica que existen sobre los 180 mil afectados con un incremento amenazador por la tasa de aumento de la enfermedad en función de la edad (Behrens y Vergara, 2007).

Este contexto genera un gran desafío para las ciencias médicas dado el aumento en el promedio de la expectativa de vida de la población mundial y la preocupación actual por mejorar la calidad de vida de los adultos mayores. Se debe considerar además que la EA es uno de los más serios problemas de salud pública por ser una de las enfermedades de mayor impacto económico de la sociedad moderna.

Esta patología neurodegenerativa se caracteriza clínicamente por una progresiva e irreversible pérdida de memoria y del aprendizaje, deterioro cognitivo y cambios en la personalidad (Maccioni y col, 2001; Weiner y Frenkel 2006; Chung 2009). En la evolución de la EA se observa una pérdida selectiva de neuronas en el hipocampo y la corteza (von Bernhardt 2005), y evidencias histológicas muestran la formación de dos tipos de agregados proteicos característicos en el cerebro de personas que padecen de la EA: las

placas seniles formados por  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) y los ovillos neurofibrilares (NTFs) formados de proteína tau alterada (Maccioni y col, 2001). Sólo los NTFs formados por la agregación de la proteína tau hiperfosforilada, autoagregada en filamentos helicoidales pareados (PHFs), son patognomónicos de la enfermedad y correlacionados directamente con su evolución clínica (Maccioni y col, 2009a), mientras que en el caso de la  $A\beta$  la correlación entre densidad de placas de amiloide y la severidad de la enfermedad en los pacientes es pobre (Hardy 1997).

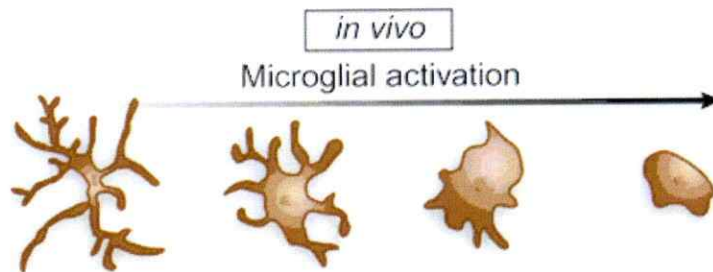
De acuerdo a investigaciones recientes, los factores que conducen al desencadenamiento de la EA son muy difusos, pero la exposición a numerosos y distintos factores de riesgo han sido asociados a su desarrollo, por lo que más que considerarla una enfermedad, el Alzheimer correspondería a un síndrome. Así, diversas alteraciones en múltiples niveles determinarían los elementos clínicos que en conjunto se identifican como *Enfermedad de Alzheimer*. Entre los factores de riesgo de la EA se debe considerar la susceptibilidad genética, es decir, que existen polimorfismos genéticos que en determinados grupos de sujetos favorecen el desarrollo de la patogénesis (Maccioni y col, 2009b). Por otro lado, existen otros factores de riesgo presentes en la vida cotidiana que incrementan el riesgo de desarrollar EA: traumatismos craneoencefálicos, una dieta rica en grasas, alteraciones en la homeostasis del colesterol, deficiencias de vitamina B12, infecciones recurrentes y sobrecarga de hierro redox en el cerebro, entre otros (Rojo y col, 2006; Lavados y col, 2008). Aunque ninguno de éstos parece ser un factor etiológico directo, se piensa que finalmente actuarían como señales de daño molecularmente traducidas en: estrés oxidativo, cambios en la respuesta inmune, activación de las células gliales, anormalidades proteicas (alteraciones postraduccionales y agregación de la proteína tau, y formación de agregados de péptido  $\beta$ -amiloide), alteraciones sinápticas y factores neurotóxicos (Fernández y col, 2008; Maccioni 2008).

## Las microglías

Las células microgliales fueron identificadas y descritas por primera vez en 1920 por Del Rio Hortega utilizando una tinción de carbonato de plata en cortes de cerebro de mamíferos donde se les pudo distinguir de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Ramirez-Exposito y Martinez-Martos, 1999). En el cerebro adulto normal éstas células representan entre el 5 y el 15% del total de la población celular del cerebro, distribuyéndose mayoritariamente en el hipocampo y en la sustancia *nigra* (Venneti y col, 2009). Estas células son consideradas las representantes del sistema inmunológico en el sistema nervioso central, dado que poseen la capacidad de realizar fagocitosis, liberar factores citotóxicos y de comportarse como células presentadoras de antígeno (Hanisch y Kettenmann, 2007).

La microglía desempeña una función clave en el desarrollo embrionario ya que puede secretar factores de crecimiento importantes para la formación del sistema nervioso central, además de contribuir a la maduración, regeneración y plasticidad neuronal. Por otra parte, estas células también intervienen en un gran número de procesos claves para el mantenimiento de la homeostasis del microambiente cerebral, mostrando variadas funciones, como por ejemplo, actúan como macrófagos activos y tienen respuesta a cualquier tipo de daño tisular (Luo y col., 2010).

Las microglías en condiciones fisiológicas se encuentran usualmente en un estado inactivado el cual se caracteriza por presentar una morfología ramificada, de cuerpo pequeño y con baja expresión de moléculas asociadas a sus funciones macrofágicas (Hanisch y Kettenmann 2007), pero pueden presentar cambios drásticos en su morfología cuando son activadas (Figura 1). Numerosas señales que representan una amenaza para la homeostasis del SNC, tales como, estructuras y/o residuos de bacterias, virus y hongos, proteínas endógenas anormales, factores del complemento, anticuerpos, citoquinas y quimioquinas, entre otros, son elementos censados por la microglía y como consecuencia inducen a su activación (Venneti y col, 2009).



**Figura 1. Extracto reproducido del artículo de Kettenmann, 2006.** Diagrama de los cambios morfológicos asociados a la activación microglial, utilizando muchos procesos la célula activada se transforma desde una estructura altamente ramificada a una forma completamente amebode.

El estado activado de las microglías no está definido por una morfología en particular pero se caracteriza por poseer escasas ramificaciones, un mayor cuerpo celular y una forma prácticamente ameboidal. En este estado las células regulan la expresión de diferentes marcadores de superficie, como el complejo de histocompatibilidad mayor II (MHCII), factores de crecimiento (Streit y col, 2008), receptores de reconocimiento de patrones (PPRs), producen citoquinas y secretan especies citotóxicas, tales como óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Meda y col, 2001; Colton y Wilcock, 2010), además de incrementar su proliferación (Venneti y col, 2009).

La activación microglial es un proceso diverso fenotípica y funcionalmente, ya que depende del tipo, de la intensidad y del contexto del estímulo si la respuesta microglial tendrá un potencial neuroprotector o pro-inflamatorio (Hanish y Kettenmann, 2007). Es precisamente este delicado balance entre lo neurotóxico y lo neuroprotectivo, así como entre lo pro-inflamatorio y lo anti-inflamatorio lo que determina el papel de la microglia en una enfermedad o en una condición de lesión determinada.

En el estado del conocimiento actual, nuestro laboratorio planteó la hipótesis de la neuroinmunomodulación en la patogénesis de la EA. Postulamos que existe una serie de señales de daño innatas, que se manifiestan de manera persistente en el tiempo, y que podrían detonar la activación microglial y provocar su activación permanente desencadenando en ellas un estado de “sobre activación” (Fernández y col, 2008; Maccioni y col, 2009 a,b; Morales y col, 2010a,b ).

Un vez que se ha detonado la sobreactivación de las células microgliales, la constante liberación de factores citotóxicos y citoquinas pro-inflamatorias origina un fenómeno neuroinflamatorio el cual está directamente relacionado con la degeneración neuronal, principalmente por efecto de las moléculas proinflamatorias. (Li y col, 2007; Rojo y col, 2008; Hirsch y Hunot 2009; Colton y Wilcock, 2010; Morales y col, 2010a), posicionando en forma directa microglías y citoquinas como agentes claves en el desarrollo de desordenes neurodegenerativos tales como la EA (Mrak, 2009).

Estudios en pacientes que han recibido drogas anti-inflamatorias no esteroidales (NSAIDs) en tratamientos prolongados han revelado una disminución en la incidencia de EA, sugiriendo que la atenuación de la respuesta inflamatoria ayudaría a prevenir o mantener baja la posibilidad de desarrollar EA (McGeer y col, 1996; McGeer y col, 2006; Fernández y col, 2008; Maccioni 2008; Town, 2010). Esto pone de manifiesto la importancia del papel que juegan las citoquinas pro-inflamatorias liberadas producto de la activación microglial, por efecto de las señales de daño, como un agente principal en el desarrollo de la EA.

### **La teoría neuroinmunomoduladora**

Entre las variadas hipótesis que buscan una explicación al desarrollo de la patogénesis de la EA, es posible mencionar que ninguna contempla la cantidad de eventos tempranos que gatillan las alteraciones metabólicas y celulares que relevantemente son las

que preceden la degeneración neuronal (Fernández y col, 2008), lo que da cuenta de la carencia de un paradigma conceptual integrado y coherente que explique la patogénesis.

Factores tan diversos, como lesiones y/o traumas encefálicos, el alto consumo de grasas, deficiencia de vitamina B, reiteradas infecciones, alteraciones en la homeostasis del colesterol y otros factores incrementan el riesgo de desarrollar la EA, pero ninguno de estos factores de riesgo, es por sí mismo un agente directo en el desarrollo de la patología dificultando aun más el desarrollo de una hipótesis explicativa (Fernández y col, 2008). Por otro lado, como fue descrito anteriormente, la microglía es una célula altamente sensible a los cambios del entorno, y cuando ocurre un estímulo fisiológico o patológico esta célula es capaz de migrar a la zona de lesión, activarse y transformarse en macrófagos fagocíticos cerebrales, representando un sistema de defensa y neuroprotección. Esta transformación es regulada y acompañada de diversas citoquinas (en su mayoría proinflamatorias) y moléculas citotóxicas (ROS, NO, factores del complemento, etc.) que permiten la comunicación con otras microglías inactivadas, células cerebrales y del sistema inmunológico.

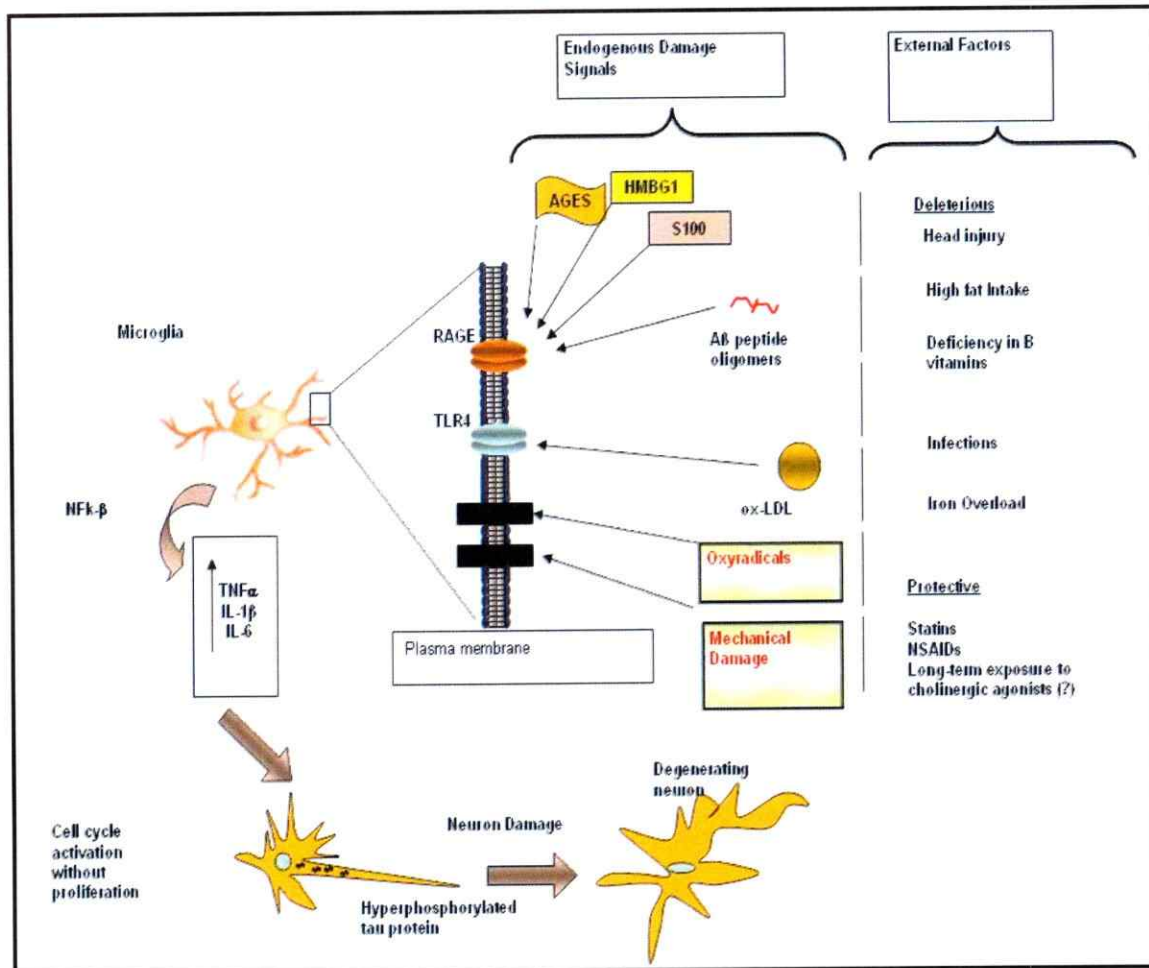
La patología ocurre cuando las señales de daño que inducen la activación microglial permanecen en el tiempo de manera inalterable, provocando la sobre activación de la célula microglial y por ende la secreción excesiva de citoquinas proinflamatorias y de moléculas citotóxicas las cuales conducen finalmente a un daño en el tejido cerebral.

Es así como en este frente de trabajo se han descrito una serie de señales de daño innatas que estarían involucradas en detonar la sobre activación de las microglías, tales como AGEs, HMBG1, proteínas S-100, oligómeros de péptido A $\beta$  (pero no los agregados fibrilares) que activan la microglía por medio de los receptores RAGE. Por otro lado oxLDL activan los TLRs, particularmente el TLR4, induciendo así la activación. Otras señales de daño, como daño mecánico y el daño generado por oxirradicales, también inducen la producción de oligómeros A $\beta$ , AGE y proteínas S-100, lo que contribuye al proceso de activación microglial (Fernández y col, 2008).



Todas estas señales de daño gatillan mecanismos de alarma en el sistema inmune innato, lo que se traduce en la activación microglial, el cual comienza con el aumento en la actividad del factor de transcripción  $\text{NF-}\kappa\text{-}\beta$  el cual induce el aumento en la producción de citoquinas  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-6}$  e  $\text{IL-1}\beta$  (Colton y Wilcock, 2010). La excesiva liberación de estas citoquinas resulta en una respuesta local inflamatoria y consecuentemente en una degradación neuronal (McGeer y col, 2006; Maccioni, 2008; Maccioni y col, 2009b; Rojo y col, 2008). Finalmente los efectos de la sobre activación microglial se resumen en la liberación excesiva de citoquinas pro-inflamatorias que generaran alteraciones en la regulación interna neuronal las que en su mayoría convergen en la alteración de la proteína tau, lo que conduce a la degeneración y posterior muerte celular.

Con estos antecedentes, obtenidos de diversos grupos de investigación, y en vista de la necesidad de un marco teórico confiable hemos propuesto como hipótesis central que una activación de largo plazo en el sistema inmune innato, producto de un conjunto de alteraciones individuales de factores de riesgo, constituye un mecanismo unificado capaz de gatillar una cascada inflamatoria que converge en alteraciones en el citoesqueleto, como agregación de tau y formación de PHFs, con consecuencias neurodegenerativas (Fernández y col, 2008; Maccioni y col, 2009b; Morales y col, 2010a,b). Esta hipótesis, denominada Hipótesis Neuroinmunomoduladora proporciona una base conceptual científicamente fundamentada, además de un mecanismo unificado que explique la diversidad de los factores de riesgo, su exposición a largo plazo y la respuesta individual a tales daños (Figura 2).



**Figura 2: Hipótesis neuroinmunomoduladora de la EA.** Señales de daño / alarma en el sistema de inmunidad innata en etapas tempranas de la patogénesis de la EA desencadenan el proceso neurodegenerativo (Fernández y col. 2008; Maccioni y col, 2009b).

## **1.2 Hipótesis para este Seminario de Título**

La exposición de microglías a señales de daño del tipo estrés oxidativo y agregados de proteína tau conducen a una sobre activación de estas células, gatillando la sobreproducción de citoquinas proinflamatorias que conllevan a la neurodegeneración.

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo General**

Determinación de la activación de microglías en cultivo en presencia de factores de estrés oxidativo y de la exposición a proteína tau.

### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Obtención de cultivo primario de microglia, aisladas de cortezas cerebrales de ratas *Sprague Dowley* neonatas.
- Determinación de la activación celular de la microglía luego de la exposición a señales de daño de tipo estrés oxidativo, mediante medición de nitritos e inmunofluorescencia.
- Purificación de la proteína tau a partir de cerebro bovino.
- Determinación de la activación celular del cultivo de microglia al exponerlo a formas moleculares que simulan la “tau patológica” en diferentes estados de agregación (proteína monoméricas y filamentos), mediante medición de nitritos e inmunofluorescencia.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Materiales**

#### **2.1.1 Reactivos Generales**

Azul de Coomasie, Azul Tripán, Borax, BSA, D-Glucosa, DTT, EDTA, EGTA, Etanol, Fluor face, Glicerol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Mes free acid, MgCl<sub>2</sub>, N-(1-naftil)-etilendiamina, NaNO<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, NaOH, p-formaldeido, Poli-L-lisina, Sacarosa, SDS, Sulfanilamida, Tris base, fueron de grado pro análisis de alta pureza.

#### **2.1.2 Reactivos para la purificación de proteína tau**

Para la purificación de tau se procedió de acuerdo al protocolo de Farias y col, (1992), en que se utilizan ambos hemisferios cerebrales de un cerebro fresco de bovino adulto. Se utilizó tampón de homogenización pH 6,8 (preparación de: Mes 0.1 M pH 6,8, glicerol 1.0 M; inhibidores de proteasas: aprotinina, leupeptina, pepstatina a concentraciones finales de 2.0 µg/mL y PMSF 0.1 mM), Tampón de Polimerización de Microtúbulos pH 6,8 (preparación de: Glicerol 2.5 M, GTP 1.0 mM, EGTA 0,5 mM y MgCl<sub>2</sub> 1.0 mM), Tampón de Homogenización de Microtúbulos-pH 2,5 (preparación de: Mes 20 mM, EGTA 0,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.5mM, EDTA 0.5 mM, DTT 1.0 mM, NaCl 0,75 mM, PMSF 0,1 mM a 4°C), Buffer Tris- HCl 2,5 mM pH 7,6 , Solución de NaOH 0,2 M. Cocktail de Inhibidores de Proteasas, Aprotinina, Leupeptina, Pepstatina (Calbiochem), GTP mínimamente hidratado (SIGMA).

#### **2.1.3 Materiales para la purificación de proteína tau**

Tubos plásticos de ultracentrífuga (Sorvall), tubos plásticos de 15 y 50 ml (Falcon), vasos de precipitado de vidrio 500 y 1000 ml, homogenizador de tejido manual *dounce* (Thomas).

#### **2.1.4 Reactivos esenciales para el Cultivo Celular**

DMEM alto en glucosa (Caisson), Ham's F-12 (Caisson), Suero Fetal Bovino (HyClone), Solución Antibiótico / Antimicótico 100X (HyClone), Poly-L-Lysina Hydrobromide (SIGMA), LPS de *Escherichia coli* serotipo 0111:B4 (SIGMA), tripsina 10X (HyClone), PBS 1X (preparado y esterilizado), Solución Salina Hank's (preparada y esterilizada).

#### **2.1.5 Reactivos para Cultivo Primario**

El cultivo primario de microglías fue realizado a partir de un cultivo primario de tejido mixto de corteza de ratas neonatas (P0) *Sprague Dowley*. Para la obtención del cultivo específico microglial las células fueron separadas del cultivo de tejido mediante agitación y de acuerdo a principios de adhesión diferencial.

#### **2.1.6 Materiales de Cultivo**

Frascos de cultivo sin filtro de superficie de 75 cm<sup>2</sup> (Falcon), placas de 96 pocillos de superficie 0,3 cm<sup>2</sup> (Orange Scientific), placas de 24 pocillos de 0,8 cm<sup>2</sup> (Orange Scientific), cubreobjetos de superficie de 0,45 cm<sup>2</sup> (TCL), placas P60 de diámetro 20 cm<sup>2</sup> de superficie (Orange Scientific), tubos de centrifuga plásticos 15 y 50 mL (Falcon), pipetas volumétricas de vidrio estériles, pipetas Pasteur de vidrio estéril y desechables, unidades de filtración desechables con poro de tamaño 0,2 μm (Orange Scientific), jeringas 5, 10, 20 y 50mL (BD Plastipak), unidades de filtración para bomba de vacío Steritop (Millipore),

#### **2.1.7 Anticuerpos**

Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes: anticuerpo Isolectina G5-IB4 conjugada con Alexa Fluor 568 de *Griffonia simplicifolia* y Faloidina Oregon Green 488.

### **2.1.8 Equipos utilizados en el seminario de título**

Ultracentrifuga Sorvall Ultra Pro<sup>80</sup> (Sorvall), lector de placas Sunrise (TECAN), Procesadora (Hamilton Beach), lupa (BAUSH y LOMB), microscopio óptico de luz clara 10X-20X-40X (Nikon), microscopio de Fluorescencia Axiovert 200M con cámara incorporada Axiocam HRM (Carl Zeiss), 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), centrifuga clínica (International equipment CO), campana de flujo laminar (FACTOMET), cámaras de electroforesis (BIO-RAD).

## **2.2 MÉTODOS**

### **2.2.1 Purificación de proteína tau**

La proteína tau fue extraída a partir de un cerebro fresco de bovino (recientemente sacrificado) al cual se le retira el cerebelo, las meninges y restos de sangre. La metodología se basó principalmente en el protocolo descrito por Farias y col, 1992. Los cerebros fueron procesados según el protocolo de ciclos repetitivos de ensamblaje y desensamblaje, dependientes de temperatura. Una vez determinado el peso del cerebro completo, el tejido se homogenizó con tampón de homogenización en una relación de volumen de 1:1 y se centrifugó por 30 minutos a 42000 g a 4°C, conservando el sobrenadante y desechando el precipitado. Luego al sobrenadante se le adicionaron los componentes necesarios para la polimerización de microtúbulos (correspondientes al tampón de Polimerización de Microtúbulos), se incubó durante 1 hora a 37°C con agitación leve y se centrifugó por 30 minutos a 42000 g a 37°C. Se desechó el sobrenadante y se conservó el precipitado, el cual fue suavemente homogenizado utilizando en homogenizador *dounce* con un volumen de tampón de homogenización de microtúbulos pH 2,5 en una relación de 3:1 en función del

volumen del precipitado, por 1 hora a 4°C. El homogenizado se calentó por 5 minutos a 100°C, se centrifugó por 40 minutos a 42000 g a 4°C, se desechó el precipitado y se conservó el sobrenadante. A continuación el sobrenadante fue dializado durante 24 horas, con cambios cada 4 horas, en buffer Tris-HCl 2,5M pH 7,6 utilizando una membrana de diálisis de corte de 12-14 KDa. El resultado obtenido de la diálisis que contiene la proteína tau fue concentrado mediante un sistema de *ultrafiltración Centricon* en una centrifugación a 2000g por 30 minutos a 4°C.

Finalmente mediante una Electroforesis en gel de Poliacrilamida al 10% en presencia de SDS y *Western Blot* se evaluó el resultado de la purificación de la proteína tau bovina. La concentración de proteína tau fue obtenida usando como coeficiente de extinción molar  $\epsilon M = 7700M^{-1}cm^{-1}$  a 280 nm (Barrantes y col, 2009).

### **2.2.2 Agregación de la proteína tau**

Para la agregación de la proteína obtenida de la purificación se utilizó el protocolo descrito por Friedhoff y col, 1998, en donde la proteína tau se agrega en presencia de heparina como agente inductor de la agregación, y la agregación se analizó mediante microscopía electrónica. Como los agregados de proteína serán adicionados a los cultivos celulares es necesario esterilizar las soluciones y preparar las mezclas en condiciones estériles. Una vez purificada la proteína y determinada su concentración, se definió la cantidad necesaria para la experimentación y ésta se resuspendió en Buffer Mes 0,1M – Glicerol 1M pH 6,8. Para esterilizar esta solución de la proteína tau se incubó por 8 minutos a 100°C.

Para esterilizar la solución de heparina, ésta se disolvió en H<sub>2</sub>O estéril y la solución fue filtrada en condiciones estériles utilizando una unidad de filtración desechable con poro de tamaño 0,2  $\mu m$ . La cantidad de heparina a utilizar se estimó para una relación de concentraciones molares de heparina: proteína tau de 1:4. Una vez realizada la mezcla de la proteína tau y heparina se incubó por 10 días a 37°C con agitación leve. Al completar el día 10 de incubación, bajo condiciones estériles, fue extraída la mezcla preparada y se



conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  en caso de no ser utilizada inmediatamente. Los agregados obtenidos pueden ser visualizados en el microscopio electrónico de transmisión.

### 2.2.3 Cultivo Primario

Tanto la obtención del cultivo primario como el de microglia se basaron en el procedimiento descrito por Lue y col. 1996, al cual se le hicieron algunas modificaciones descritas en detalle a continuación. 24 horas antes de realizar el cultivo primario los frascos T-75 fueron tratados con poli-L-lisina, colocando 8 ml de una solución estéril de poli-L-lisina a una concentración de 1mg/ml e incubando toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$  en aire con 5% de  $\text{CO}_2$ . Al día siguiente, previo al cultivo, se recuperó la solución de poli-L-lisina y los frascos fueron lavados con agua estéril por tres veces; de esta manera los frascos quedan listos para depositar las células en su interior.

A partir de la extracción del cerebro completo de una rata neonata *Sprague Dawley* (de no más de 24 horas), en condiciones estériles, fueron separados los hemisferios cerebrales, se les retiraron y desecharon las meninges y el cerebelo. Una vez limpios los hemisferios fueron lavados tres veces con solución salina Hanks a  $4^{\circ}\text{C}$  para desprender y retirar todos los restos de las meninges. Luego, utilizando la bomba de vacío, se extrajo la solución salina y los hemisferios fueron cortados mecánicamente en pequeños pedazos y expuestos a tripsina 1X, con una relación volumétrica de  $500\mu\text{l}$  por cada par de hemisferios, e incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. Para inactivar la acción de la tripsina se adicionaron 2 volúmenes de medio DMEM-F12, el tejido se resuspendió y se homogenizó utilizando una pipeta estéril. El homogenizado fue centrifugado por 10 minutos a 75 g a temperatura ambiente. Mediante succión con una bomba de vacío se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en medio fresco DMEM-F12 (en 4 ml de medio fresco por cada par de hemisferios) y depositado en frascos de cultivo T-75, los que fueron incubados durante toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$  en aire con 5% de  $\text{CO}_2$ .

Al día siguiente por medio de succión con bomba de vacío y en condiciones estériles, se eliminó todo el medio contenido en los frascos y se reemplazó por 15 ml de

medio fresco DMEM-F12. Los frascos con células fueron incubados por 14 días, realizando cambios de medio (de la mitad del contenido) cada 2 días. Luego del día 14 se dejó en reposo hasta el día 21.

#### **2.2.4 Cultivo de Microglia**

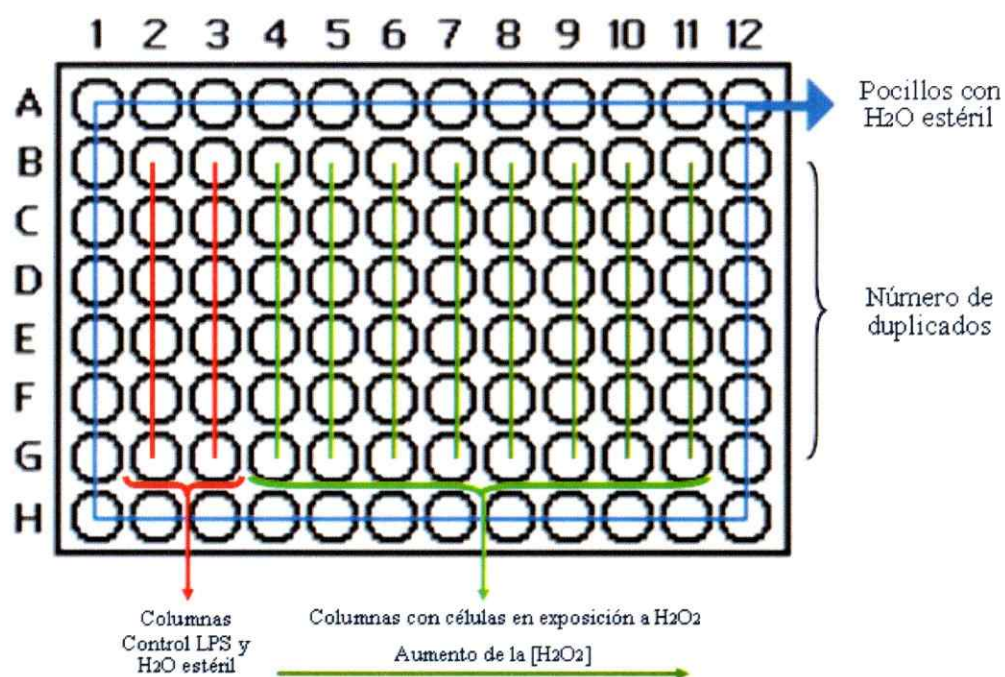
A partir del día 21 del cultivo primario los frascos fueron retirados de la incubadora y bajo condiciones estériles se extrajo todo el medio. Este se deposita en tubos Falcon estériles y se centrifugan por 10 minutos a 75 g. El medio retirado a partir de ahora es denominado medio condicionado. Por otro lado, los frascos fueron rellenos con 6 ml de medio fresco DMEM-F12 (a temperatura ambiente) y agitados con un agitador orbital por 30 minutos a 200 rpm a temperatura ambiente. Posteriormente el medio de los frascos fue depositado en tubos Falcon, y centrifugados por 10 minutos a 75 g. Los frascos T-75 vacíos son rellenos con 15 ml de medio fresco DMEM-F12 e incubados a 37°C en aire con 5% de CO<sub>2</sub> por 7 días, hasta la próxima cosecha celular. Luego de la centrifugación, el sobrenadante fue desechado y las células resuspendidas en medio condicionado a una razón de un volumen de 1 ml por frasco de cultivo (T-75). Las células resuspendidas fueron contadas utilizando la cámara de Neubauer, y luego depositadas en los pocillos de las placas de cultivo e incubadas por 10 minutos a 37°C en aire con 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente se extrajo el medio de los pocillos y se desechó. Este fue reemplazado por medio fresco DMEM-F12 (volumen según tamaño del pocillo) y se incubó a 37 °C en aire con 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 días para estabilizar las células luego del estrés sometido.

#### **2.2.5 Exposición de Microglías a Peróxido**

Pasadas 48 horas del cultivo a 37°C en aire con 5% de CO<sub>2</sub> las microglías se observaban con su morfología y características normales. Para evaluar el efecto de señales que pueden inducir la cascada de activación, las células fueron expuestas a peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). El volumen de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se adicionó a las células no fue mayor al 10% del volumen total, con el fin de no alterar mayormente las condiciones iniciales en que se encuentran las células. De esta manera si las microglías fueron depositadas en placas de 24

pocillos el volumen máximo para agregar  $H_2O_2$  fue de  $50\mu l$ , y en el caso de las placas de 96 pocillos el volumen máximo fue de  $10\mu l$ .

Las células fueron expuestas a un rango de concentraciones que van desde los  $0,5-500\mu M H_2O_2$ , en triplicado y sextuplicado (si eran placas de 24 y de 96 pocillos respectivamente) y posteriormente incubadas por 48 horas a  $37^\circ C$  en aire con 5% de  $CO_2$ . Como control positivo de activación celular las microglías fueron expuestas a LPS 2,5 y 5  $\mu g/ml$  (Willis y col, 2010), y como control negativo de activación celular las microglías fueron expuestas a  $H_2O$  estéril. En placas de 96 pocillos las concentraciones utilizadas fueron distribuidas como se observa en la Figura 3.



**Figura 3: Ejemplo gráfico de cultivo microglial en placas de 96 pocillos.** Se muestra la distribución experimental de la exposición de las células a las diferentes concentraciones de  $H_2O_2$ .

### **2.2.6 Exposición de microglías a proteína tau**

Pasadas 48 horas del cultivo de microglías a 37°C en aire con 5% de CO<sub>2</sub> diferentes placas con células fueron expuestas a proteína tau monomérica ó a proteína tau agregada (según protocolo de agregación descrito con anterioridad). El volumen de proteína que se adicionó a las células fue menor al 10% del volumen total, con el fin de no alterar mayormente las condiciones iniciales en que se encuentran las células. De esta manera si las microglías fueron depositadas en placas de 24 pocillos el volumen máximo para agregar es de 50µl, y en el caso de las placas de 96 pocillos el volumen máximo es de 10µl.

Las células se expusieron a concentraciones de proteína desde los 0,2-50µg/ml, en estado monomérico y agregado, en triplicado y quintuplicado (si eran placas de 24 y de 96 pocillos respectivamente) y posteriormente incubadas durante 48 horas a 37°C en aire con 5% de CO<sub>2</sub>. Como control positivo de activación celular las microglías fueron expuestas a LPS 5 µg/ml, como control negativo de activación celular las microglías fueron expuestas a H<sub>2</sub>O estéril y a buffer Mes-Glicerol. En el caso de las células expuestas a proteína tau agregada se consideró la realización del control con heparina 0,1µM, por ser esta la mayor concentración de heparina a la que fueron expuestas la microglías.

### **2.2.7 Medición de Nitritos**

Pasadas 48 horas de exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y proteína tau, en condiciones estériles, se extrajeron 50 µl de medio condicionado de cada pocillo de microglías y se depositaron en el pocillo correspondiente de una nueva placa de 96 pocillos. Posteriormente se adicionó 10µl de EDTA 0,5M y 60µl de reactivo de Griess (Miranda y col, 2001) por pocillo, y una solución de N-1-(naftil) etilendiamina dihidrocloruro (0,1% p/v en 5% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) con sulfanilamida (1% p/v en 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) protegida de la luz. Esta solución se preparó inmediatamente antes de realizar la reacción colorimétrica. Una vez que se mezcla del reactivo de Griess con el EDTA y el medio condicionado se dejó reposar por 5 minutos y se monitoreó el nivel de nitritos por el cambio colorimétrico en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 546nm.

### **2.2.8 Inmunofluorescencia**

Para realizar las inmunofluorescencias las células microgliales fueron cultivadas en cubreobjetos previamente depositados en placas de 24 pocillos. Los cubreobjetos que contiene las microglías adheridas fueron lavados con PBS 1X bajo condiciones estériles. Las células fueron fijadas con una solución de paraformaldehído 4% y sacarosa 4% en PBS 1X durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS 1X por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego los cubreobjetos fueron bloqueados por 1 hora con una solución de PBS 1X y BSA 5% a temperatura ambiente, o a 4°C durante toda la noche. A continuación en una cámara oscura y húmeda los cubreobjetos fueron incubados por 90 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo Isolectina G5-IB4 conjugado con Alexa Fluor 568 y Faloidina, diluidos 1:200 y 1:300 respectivamente en una solución de PBS 1X y BSA 5%. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS 1X por 5 minutos a temperatura ambiente, los cubreobjetos sumergidos en H<sub>2</sub>O, secados y depositados sobre una gota de 7µl de Fluorface en un porta objetos. Se dejaron secar inmóviles y en oscuridad a temperatura ambiente hasta que el Fluorface solidificó. Finalmente se guardaron en oscuridad a 4°C.

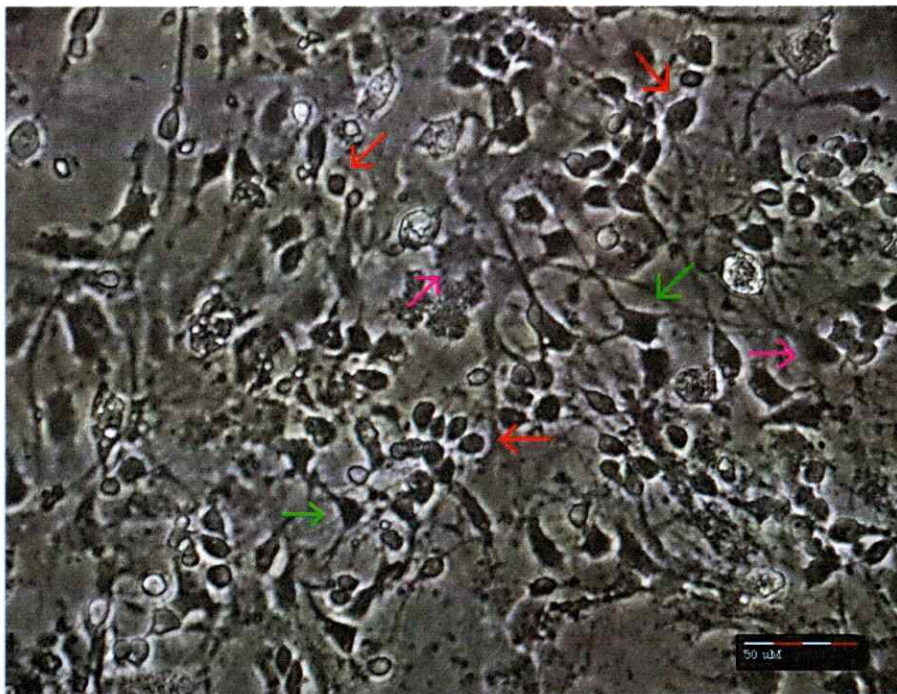
### **2.2.9 Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se utilizó el programa computacional PAST, con el cual se obtuvo los resultados del análisis comparativo de la varianza (ANOVA) de los valores de nitritos en el medio extracelular que fueron registradas en cada medición.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Obtención de cultivo primario extraído de corteza completa de rata neonata

Siguiendo el procedimiento descrito en la Metodología para la obtención del cultivo primario de corteza, se obtuvo un cultivo mixto de células como el que se observa en la Figura 4. En este cultivo de 10 días se aprecian distintos tipos celulares, tales como astrocitos, microglia y neuronas. Se destacan las microglia como esferas brillantes adheridas sobre la formación de una primera capa de células mayoritariamente compuesta de astrocitos, los que se encuentran extendidos por toda la superficie basal del frasco de cultivo.



**Figura 4: Cultivo primario de corteza de 10 días.** Imágenes de células en campo claro obtenidas desde un microscopio óptico de luz clara, donde a modo de ejemplo las flechas rojas señalan células microgliales, flechas verdes células neuronales y flechas lila células astrogliales. Barra = 50  $\mu\text{m}$ .

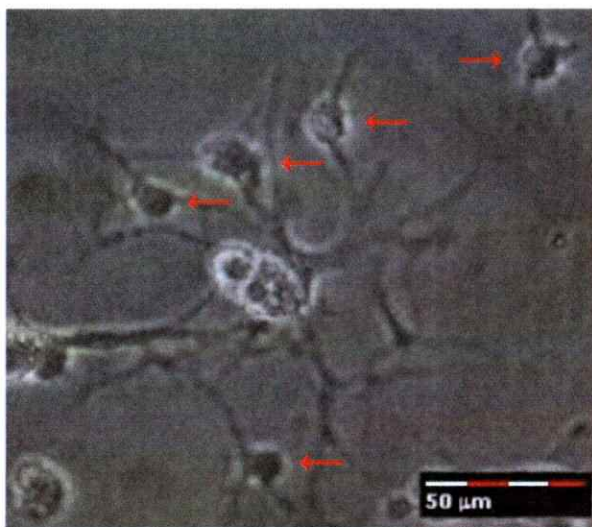
Cabe hacer notar que estos cultivos tienen una duración de 42 días, y que de ellos se pueden obtener de 3 a 4 cultivos microgliales, por lo que fue necesario realizar estos cultivos periódicamente.

### **3.2 Aislamiento de microglías desde cultivo primario de corteza.**

Pasado el día 14 del cultivo primario de corteza (o cultivo mixto) el frasco de cultivo fue incubado por 7 días sin cambio de medio, y manteniendo las condiciones de incubación, para estimular la diferenciación celular por escasez de nutrientes. De esta forma a partir del día 21 de cultivo se realizó el aislamiento de células microgliales.

Dado que las microglías tienen una velocidad de adherencia a superficies plásticas mayor que el resto de los tipos celulares presentes en el cultivo mixto, el aislamiento se realizó por adhesión diferencial (Lue y col, 1996) y por lo tanto no hubo necesidad de incorporar polilisina en las nuevas placas de cultivo. De acuerdo a la metodología descrita para el cultivo de microglías, la mezcla de células sometidas a una agitación orbital de los frascos de cultivo fue depositada en las placas de cultivo de 96 pocillos o en las de 24 pocillos, dependiendo si la finalidad era realizar un ensayo de determinación de nitritos o una inmuno fluorescencia respectivamente. Una vez realizados los pasos de obtención de cultivo microglial, las células se dejaron estabilizar por 48 a 72 horas antes de recibir cualquier tratamiento, dado el estrés celular asociado al procedimiento. Finalmente se obtuvo un cultivo de microglías como se muestra en la Figura 5.





**Figura 5: Cultivo de microglia no activadas con 48 horas de reposo.** Imágenes de células en campo claro obtenidas desde un microscopio óptico de luz. Flechas rojas señalan algunas de las células microgliales presentes en el cultivo. Barra = 50  $\mu\text{m}$ .

### **3.3 Exposición de cultivos microgliales a $\text{H}_2\text{O}_2$ y determinación de la activación microglial.**

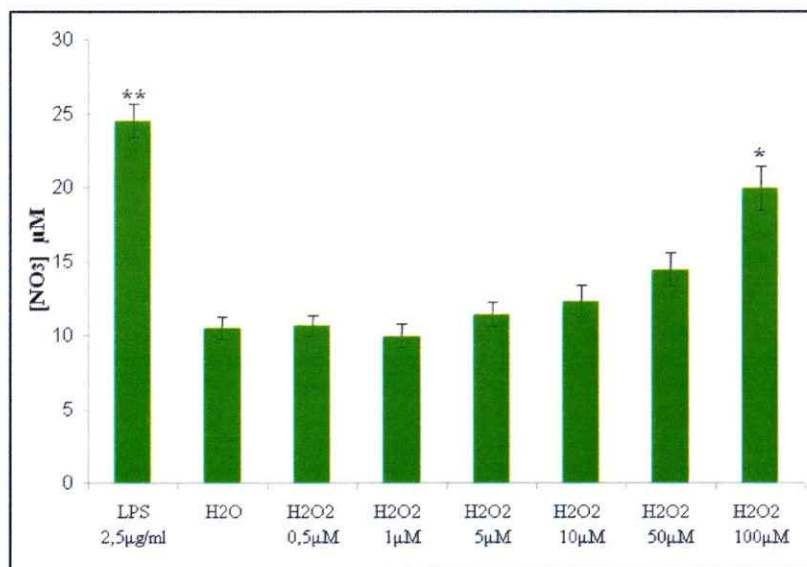
Pasadas 48 horas de reposo de los cultivos microgliales y según las características morfológicas observadas en el microscopio óptico, las células fueron expuestas a 8 concentraciones diferentes de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y los resultados analizados (Figura 6).

#### **3.3.1 Resultados de la determinación de nitritos**

Luego de incubar las células con las diferentes concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 48 horas se determinó la activación microglial midiendo la concentración de nitritos presentes en el medio extracelular por efecto de la liberación de NO desde la microglia activada. Los resultados de las mediciones fueron estandarizados utilizando una curva de calibración de  $\text{NaNO}_2$  desde los  $10\mu\text{M}$  a  $1\text{mM}$ , y analizó la absorbancia del contenido de cada uno de los



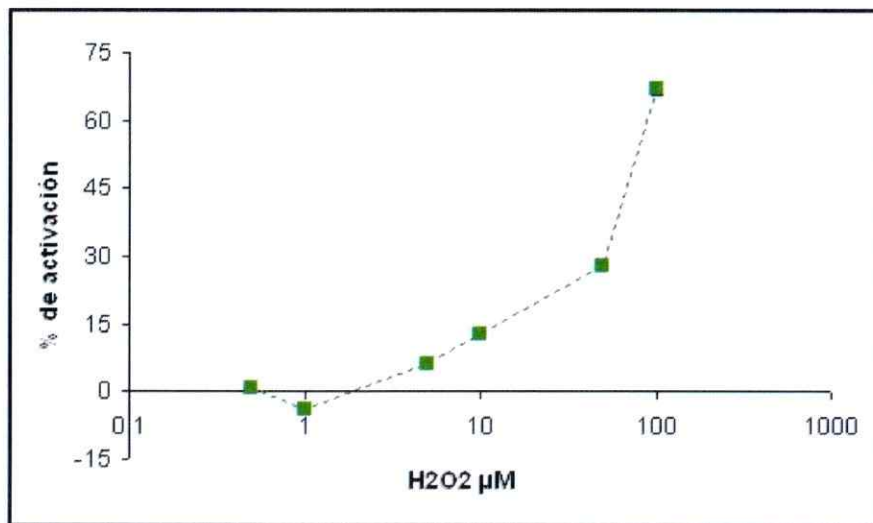
pocillos con una concentración de nitritos determinada por la curva de calibración. El máximo de repeticiones de un experimento fue de 27 veces y el mínimo fue de un n=17. En todos los casos se obtuvo la media aritmética como valor representativo de las concentraciones y el error asociado al cálculo del promedio.



**Figura 6. Determinación de nitritos en el medio extracelular de células expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Promedio de la concentración de nitritos en el medio extracelular de células microgliales expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los valores corresponden a la media aritmética con sus respectivas desviaciones estándar. La realización de un ANOVA de las muestras arroja para la muestra grupal un valor de  $p < 1 \times 10^{-9}$  donde (\*) presento la mayor diferencia significativa cuando se analizó con respecto a las otras muestras ( $p < 0,003$ ) y (\*\*) presento una diferencia significativa del 5% con respecto a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μM ( $p < 0,05$ ) y presento un valor de  $p < 1 \times 10^{-5}$  con respecto al resto.

A partir de estos resultados se construyó una grafica del porcentaje de activación celular asociado a la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la que fueron sometidas las células (Figura 7). Para determinar el 100% de activación se consideró la activación registrada

(concentración de nitritos en el medio extracelular) con el control de LPS 2,5 µg/ml y se resto la activación basal correspondiente a la activación registrada con el control de H<sub>2</sub>O.



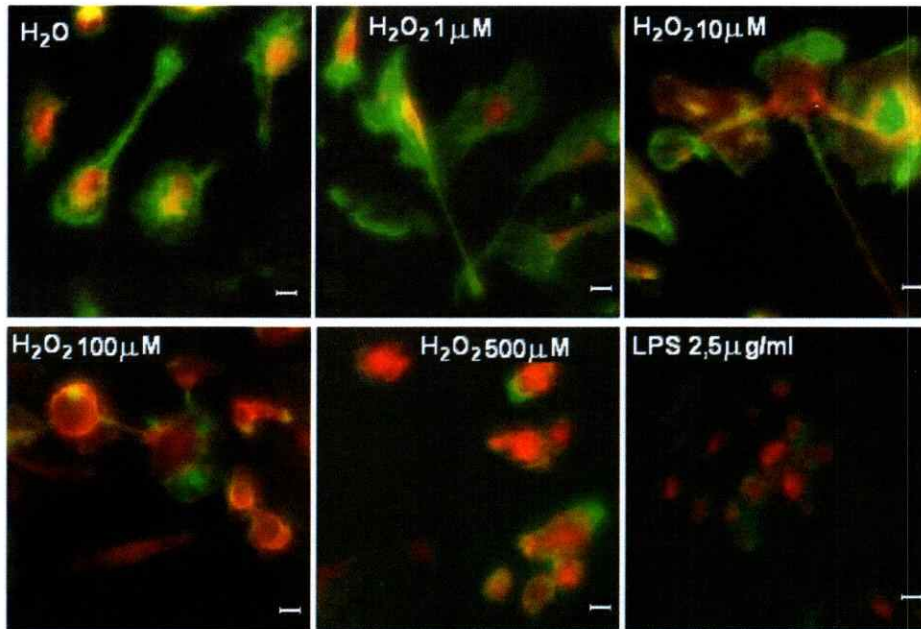
**Figura 7. Porcentaje de activación microglial.** Cálculo del porcentaje de activación asociado a las diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a las que fueron expuestos los cultivos en función de la activación celular presentada por la exposición a LPS.

Al exponer las células microgliales a diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estas revelan un aumento en la activación celular, dada la concentración detectada de nitritos del medio extracelular, la cual va en aumento conforme aumenta la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el medio extracelular.

### 3.3.2 Inmunofluorescencia de células microgliales en exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

A partir de un cultivo microglial, desarrollado sobre cubreobjetos de vidrio en placas de 24 pocillos, incubado con las diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 48 horas, se determinó la activación celular por medio de los cambios morfológicos observados mediante técnicas de inmunofluorescencia. Nuevamente se utilizó LPS como control positivo de activación, a una concentración de 2,5 µg/ml, y H<sub>2</sub>O estéril como control negativo de activación. Como marcador específico para microglías se utilizó Isolectina G5-

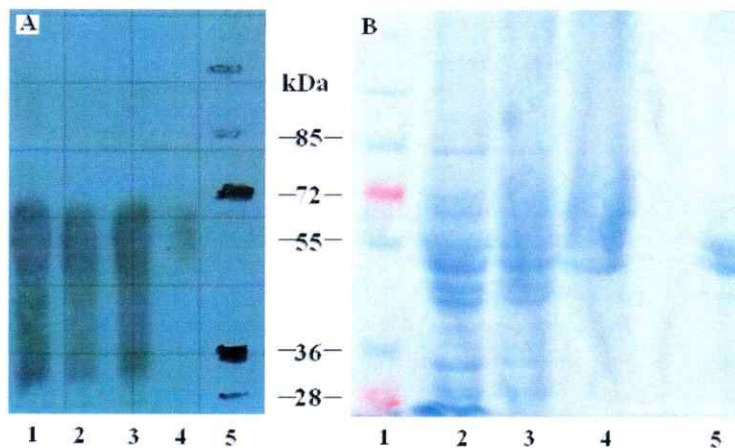
IB4 conjugada con Alexa Fluor 568 y para observar la morfología del citoesqueleto celular se utilizó Faloidina. Los resultados de la inmunofluorescencia revelan cambios notables en la morfología celular producto de la exposición a concentraciones  $H_2O_2$ , la cual cambia desde un estado ramificado, o con prolongaciones, a uno completamente ameboideo con la completa ausencia de las prolongaciones iniciales (Figura 8).



**Figura 8. Inmunofluorescencia de cultivos microgliales expuestos a  $H_2O_2$ .** Demostración de activación microglial por cambios morfológicos gatillados por la exposición a concentraciones crecientes de  $H_2O_2$ . Las imágenes muestran marcaje del citoesqueleto de actina (en verde) y de células microgliales (en rojo). Barra = 5  $\mu$ m.

### 3.4 Purificación de proteína tau a partir de cerebro de bovino.

La proteína tau bovina obtenida de la purificación fue cargada en un gel SDS-PAGE al 10%, y después de la electroforesis teñida con azul de Coomassie y verificada mediante *Western Blot* con el fin de evaluar la pureza de proteína tau (Figura 9). La concentración de proteína purificada se calculó usando como coeficiente de extinción molar de proteína tau  $\epsilon_M = 7700M^{-1}cm^{-1}$  a 280 nm (Barrantes y col, 2009). La concentración obtenida fue de 0,85 mg/ml.



**Figura 9. Purificación de proteína tau bovina.** A) *Western blot*: Muestra las seis isoformas de la proteína tau obtenidas de su purificación entre 55 kDa y 65 kDa. Carril 1: Sobrenadante de extracto de cerebro bovino, Carril 2: Sobrenadante de polimerización de microtúbulos, Carril 3: Precipitado de tratamiento con ácido y shock térmico, Carril 4: proteína tau dializada, Carril 5: Estándar de peso molecular All Blue (catalog #161-0373 BIO-RAD). B) SDS-PAGE: muestra de la purificación de la proteína tau bovina en gel de poliacrilamida 10% con tinción azul de Coomassie. Carril 1: Estándar de peso molecular All Blue (catalog #161-0373 BIO-RAD); Carriles 2: Sobrenadante de extracto de cerebro bovino, Carril 3: Sobrenadante de polimerización de microtúbulos, Carril 4: Precipitado de tratamiento con ácido y shock térmico, Carril 5: proteína tau purificada y dializada que muestra un patrón de isoformas.



### **3.5 Ensayos de agregación de proteína tau**

La formación de agregados de proteína tau por efecto de la heparina fue monitoreada en alícuotas 50  $\mu$ l de las muestras en incubación mediante Microscopía Electrónica de Transmisión. Se observó la formación de agregados aislados por efecto de la concentración de proteína incubada: 500, 50, 20  $\mu$ g/ml (no mostrado).

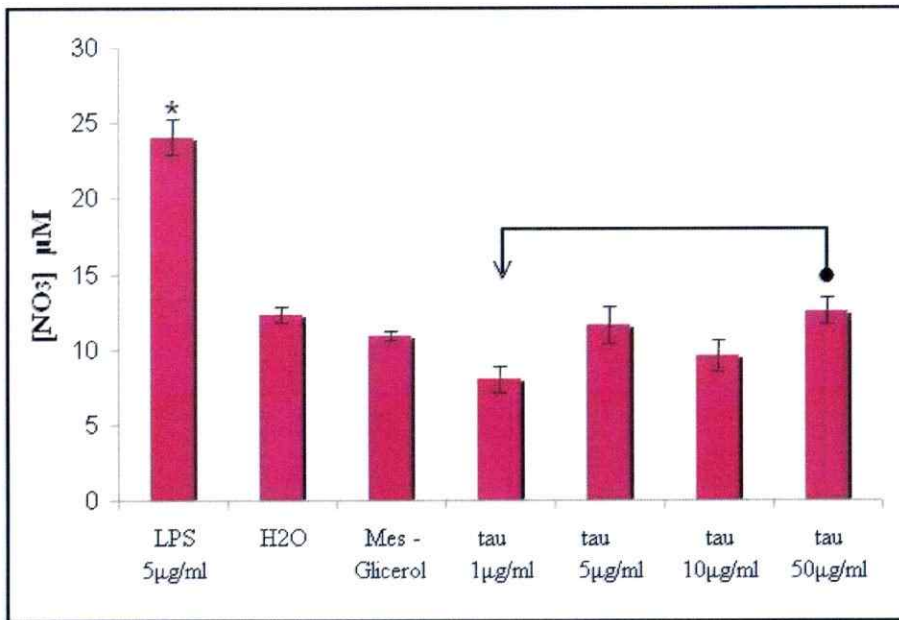
### **3.6 Exposición de cultivos microgliales a proteína tau y determinación de la activación microglial.**

#### **3.6.1 Determinación de nitritos en exposición a proteína tau monomérica.**

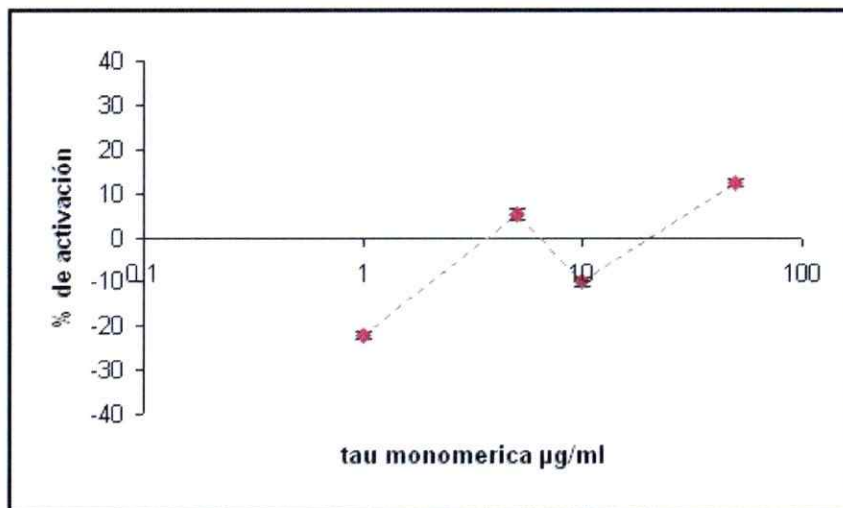
Consideramos como proteína tau monomérica a la proteína obtenida por la purificación desde cerebro de bovino sin tratamiento de agregación, esterilizada mediante condiciones de alta temperatura, donde la proteína tau no se ve afectada dada su resistencia a altas temperaturas. Una vez transcurridas las 48 horas de incubación de los cultivos microgliales y según las características morfológicas observadas en el microscopio óptico, las células fueron expuestas durante 48 horas a 4 concentraciones distintas de la proteína tau monomérica. Estas concentraciones son 50  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml y 1  $\mu$ g/ml, y todas con entre 7 y 9 repeticiones experimentales. Como controles experimentales se considero someter el cultivo microglial al buffer de dilución estéril en el cual esta contenida la proteína (Tampón de Homogenización), a una solución estéril de LPS al 5  $\mu$ g/ml y a finalmente a H<sub>2</sub>O estéril.

Para determinar la activación celular se midió la concentración de nitritos liberados por las células al medio extracelular, siguiendo el mismo procedimiento de medición utilizado con los ensayos experimentales de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En todos los casos experimentales se obtuvo como valor representante la media aritmética y el error estándar asociado a éste cálculo (Figura 10). Para la validación estadística de los valores obtenidos se realizó un ANOVA de los datos comparando las diferencias significativas en cuanto al grupo de datos y entre los mismos datos.

A partir de los resultados obtenidos en la medición de la concentración de nitritos se construyó una grafica del porcentaje de activación celular en función de la concentración de la proteína tau en estado monomérico al que fueron sometidas las células (Figura 11). Para determinar el 100% de activación se consideró la activación registrada con el control positivo, en este caso de LPS 5  $\mu\text{g/ml}$  y se resto el valor de la activación basal obtenido con el control Mes 0,1M – Glicerol 1M.



**Figura 10. Determinación de nitritos en el medio extracelular de células expuestas a proteína tau monomérica.** Promedio de la concentración de nitritos en el medio extracelular de células microgliales expuestas a proteína tau en estado monomérico. La realización de un ANOVA, para la muestra grupal, arrojó un valor de  $p < 0,001$ , a pesar de ello al hacer el análisis comparativo entre las muestras no presentaron diferencias significativas con respecto a las otras, salvo entre tau 50  $\mu\text{g/ml}$  y tau 1  $\mu\text{g/ml}$ , que presentaron un  $p < 0,03$ . Sólo el control positivo presentó diferencias significativas con la totalidad de las muestras  $p < 0,0001$  (\*).



**Figura 11. Porcentaje de activación microglial.** Cálculo del porcentaje de activación asociado a diferentes concentraciones de proteína tau monomérica a las que fueron expuestos los cultivos microgliales.

Al exponer las células microgliales a diferentes concentraciones de proteína tau en estado monomérico, éstas no revelaron un aumento de la activación celular asociado al aumento en la concentración de la proteína, según lo registrado por la medición de nitritos en el medio extracelular. Esto fue respaldado a ver el resultado del análisis ANOVA con un  $p < 0,001$  de muestreo grupal y donde la diferencia mas significativa entre las muestras fue de un 3% (Figura 10).

### 3.6.2 Determinación de nitritos luego de exposición a proteína tau agregada.

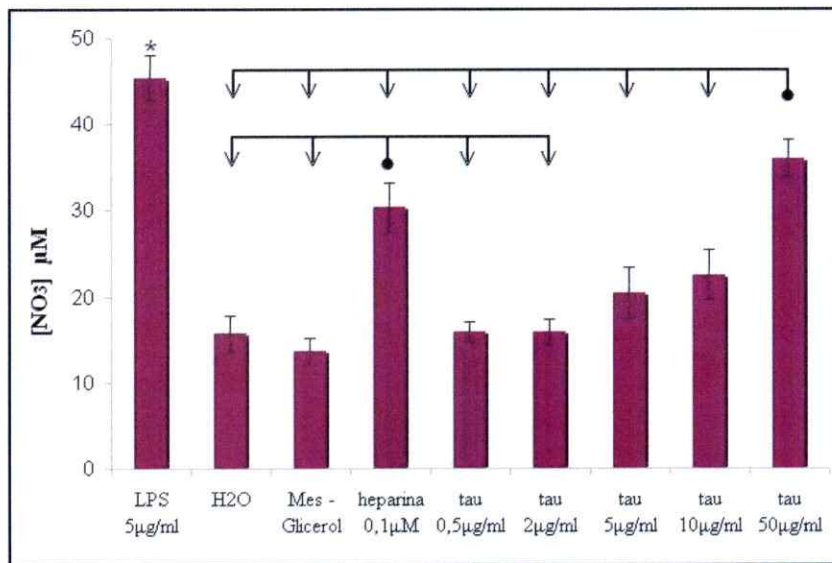
Para obtener proteína tau agregada la proteína se trató con un agente que induce su autoagregación. Se utilizó heparina a una concentración en relación 1:4 mol/mol respecto a la proteína tau. Para inducir la agregación se siguió la metodología descrita en el punto 2.2.2.

A partir de un cultivo de microglías incubado por 48 horas para estabilizar las células y según las características morfológicas observadas en el microscopio óptico, las células fueron expuestas por 48 horas a 5 concentraciones distintas de proteína tau agregada. Estas concentraciones fueron: 50  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$  y 1  $\mu\text{g/ml}$ . Se realizaron entre 5 y 7 repeticiones experimentales. Como controles experimentales se sometió el cultivo microglial al buffer de dilución estéril en el cual está contenida la proteína (Tampón de Homogenización, Mes 0,1M- Glicerol 1M), a una solución estéril de LPS al 5  $\mu\text{g/ml}$ , a  $\text{H}_2\text{O}$  estéril y finalmente a una solución estéril de heparina 0,1  $\mu\text{M}$ . La concentración de heparina utilizada como solución control fue fijada en función de la mayor concentración de heparina presente en la solución de proteína tau agregada, correspondiendo así a la solución de proteína tau agregada a 50  $\mu\text{g/ml}$ .

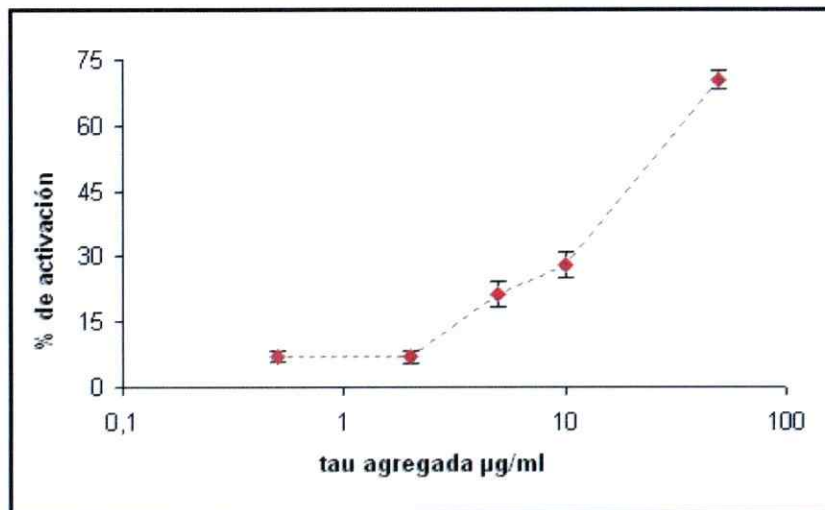
Para determinar la activación celular se midió la concentración de nitritos liberados por las células al medio extracelular, siguiendo el mismo procedimiento de medición utilizado con los ensayos experimentales de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y proteína tau monomérica. En todos los casos experimentales se obtuvo como valor representante la media aritmética de las concentraciones, considerando el error estándar asociado al cálculo del promedio. Adicionalmente se realizó un ANOVA de los datos obtenidos como test estadístico de validación de las diferencias observadas, sobre todo entre el control de heparina y proteína tau agregada de 50  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 12).

Con estos resultados se construyó una gráfica del porcentaje de activación celular asociado a la concentración de proteína tau agregada a la que fueron sometidas las células (Figura 13). La determinación del 100% de activación fue considerada por la medición de nitritos en el medio extracelular registrada en las células expuestas a LPS 5  $\mu\text{g/ml}$  y se restó el valor de la activación basal, activación registrada al exponer a la células al agente control Mes 0,1M – Glicerol 1M.





**Figura 12. Determinación de nitritos en el medio extracelular de células expuestas a proteína tau agregada.** Promedio de la concentración de nitritos en el medio extracelular de células microgliales expuestas a proteína tau en estado agregado. La realización de un ANOVA de las muestras arrojó un valor de  $p < 1 \times 10^{-6}$ , donde sólo la muestra de tau 50  $\mu\text{g/ml}$  presentó diferencias significativas con la mayoría de las muestras ( $p < 0,04$ ), y heparina 1  $\mu\text{M}$  presentó diferencias significativas con tau 0,5 y 2  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,002$ ). (\*) presentó diferencias significativas con el resto de la muestra ( $p < 0,001$ ).



**Figura 13. Porcentaje de activación microglial.** Cálculo del porcentaje de activación asociado a diferentes concentraciones de proteína tau agregada a las que fueron expuestos los cultivos microgliales.

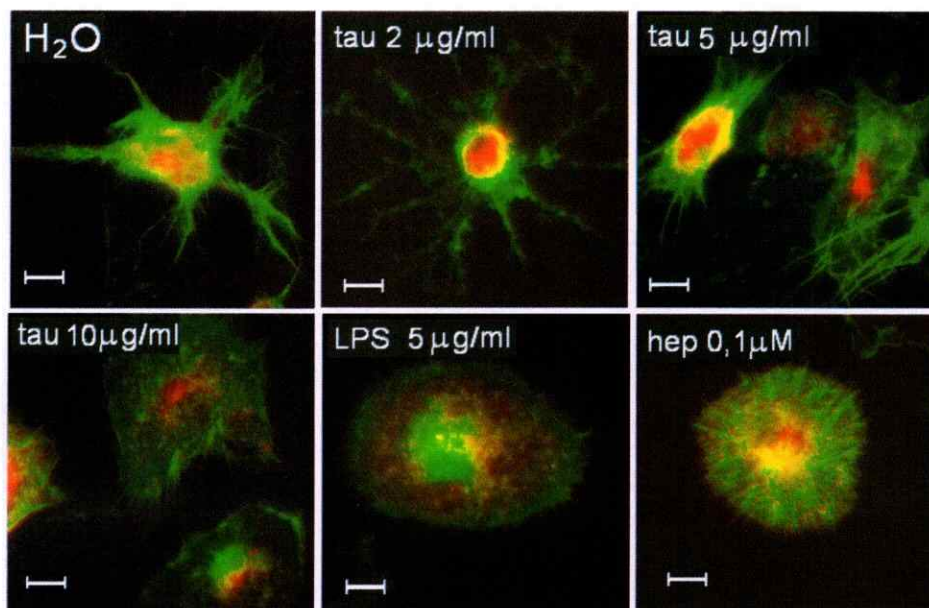
Al exponer las células microgliales a diferentes concentraciones de proteína tau agregada éstas revelaron un aumento gradual de la activación celular asociado al aumento en la concentración de la proteína, esto según lo registrado en la medición de nitritos presentes en el medio extracelular y respaldado por el resultado del ANOVA de grupo ( $p < 1 \times 10^{-6}$ ). El porcentaje de activación, en el último caso, superó el 60% de activación lo cual permite suponer una activación mayor en función del aumento en la concentración de la proteína en comparación a lo registrado con la proteína en estado monomérico. Esto se ve confirmado en la Figura 13 donde se observó una clara tendencia al aumento de la activación en función de la dosis de proteína utilizada.

### **3.6.3 Inmunofluorescencia de células microgliales expuestas a proteína tau agregada.**

A partir de un cultivo microglial, desarrollado sobre cubreobjetos de vidrio en placas de 24 pocillos, incubado por 48 horas con las diferentes concentraciones de proteína tau agregada, se determinó la activación celular por medio de los cambios morfológicos observados por medio de inmunofluorescencia. Se utilizó LPS como control positivo de activación, a una concentración de 5  $\mu\text{g/ml}$  y  $\text{H}_2\text{O}$  estéril como control negativo de activación. También se consideró como control la exposición de las células microgliales al buffer de dilución estéril en el cual está contenida la proteína (Tampón de Homogenización) y a una solución estéril de heparina 0,1  $\mu\text{M}$ , para descartar los efectos producidos por estos factores adicionales. Como marcador específico para microglías se utilizó Isolectina G5-IB4 conjugada con Alexa Fluor 568 y para observar la morfología del citoesqueleto celular se utilizó Faloidina.

Los resultados de la inmunofluorescencia revelan considerables cambios en la morfología celular producto de la exposición a diferentes concentraciones de proteína tau agregada (Figura 14). La morfología celular presentó cambios desde un estado con prolongaciones, a uno completamente ameboideo y muy expandido, con ausencia de prolongaciones iniciales (Figura 14). Por otro lado la exposición de los cultivos a heparina

también refleja un cambio importante en la morfología celular, la cual se presentó ameboidea, expandida y fibrosa (Figura 14).



**Figura 14. Inmunofluorescencia de cultivos microgliales expuestos a proteína tau agregada.** Inmunofluorescencia de cultivos microgliales expuestos a concentraciones ascendentes de proteína tau agregada y LPS. Las imágenes muestran marcaje del citoesqueleto de actina (en verde) y de células microgliales (en rojo). Barra = 5 µm.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1 Cultivo de microglías.

Es importante discutir aspectos metodológicos claves para este seminario de título. Fue necesario realizar numerosos cultivos de microglia para estandarizar y ajustar el protocolo de microglías obtenidas a partir de un cultivo primario de corteza. Se hicieron algunos ajustes al protocolo inicial, como el tiempo y forma de agitación de los frascos de células, con el fin de buscar el tiempo óptimo donde se soltaran más células y no se vieran afectadas para su posterior cultivo. Para esterilizar los cubreobjetos estos fueron sumergidos en etanol al 70%, flameados bajo campana para mantener las condiciones estériles y depositados inmediatamente en las placas de cultivo de 24 pocillos donde se llevó a cabo del cultivo de microglías. Existen otras metodologías para eliminar los restos orgánicos que se depositan en la superficie de los cubreobjetos, como el tratamiento con ácido nítrico, pero los resultados obtenidos utilizando este tratamiento no tuvieron diferencias relevantes en comparación a los resultados obtenidos con el tratamiento de etanol 70%, por lo que los cubreobjetos no fueron tratados con ácido nítrico (no mostrado).

La diversidad celular presente en los frascos de cultivo a contar del día 10 (Figura 4) contempla mayoritariamente células microgliales y astrogliales, se observan muy pocas neuronas, esto debido a que el medio de cultivo utilizado (DMEM F-12) favorece el crecimiento de estos tipos celulares, no así el de neuronas u otros. En la Figura 4 es posible distinguir que las células astrogliales se ubican en un plano inferior a las células microgliales y neuronales, como formado una monocapa de células que sirve de suelo y sustento para los otro tipos celulares, y sobre ellas se posicionan microglías y neuronas.

Por otra parte, una vez que son extraídas las células microgliales del cultivo mixto de tejido estas deben permanecer por al menos 48 horas incubadas sin recibir cambios de medio para inducir su estado de reposo el que se ve representado en la Figura 5, ya que el estrés mecánico al que son sometidas las células en el proceso de agitación y desprendimiento activa a la microglia, obligando a realizar un periodo de normalización una vez que son depositadas en nuevas placas.

#### 4.2 Efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células microgliales.

La generación de ROS es un proceso normal asociado a la respiración mitocondrial y a la respuesta inflamatoria. Este proceso se ve incrementado con el envejecimiento celular por efecto de la pérdida en la eficiencia, o bien aumenta su acumulación por diversos procesos inflamatorios. Es por esto que el estrés oxidativo puede tener un papel causal o bien estaría involucrado en la propagación del daño celular en patologías como la EA (Bonda y col, 2010; Markesbery, 1999). El NO al encontrarse en grandes cantidades se combina con el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) formando peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) originando no sólo estrés oxidativo sino también nitrosativo, asociados a la disfunción mitocondrial y al consecuente daño mitocondrial (von Bernhardt 2005). Al ser activada la microglía libera citoquinas pro-inflamatorias, NO y citotoxinas capaces de dañar a otras células aledañas, a las neuronas, o bien capaces de propagar el proceso inflamatorio (von Bernhardt y Eugénin, 2004; von Bernhardt 2005).

Las microglías se activan cuando son expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esto fue evidenciado en la detección de los nitritos presentes en el medio extracelular, con las imágenes de las inmunofluorescencias y corroborado con el análisis estadístico de las muestras. Los cambios evidenciados en la morfología dan cuenta del paso de una forma celular ramificada a otra expandida y muy ameboidea, donde casi no es visible la morfología celular e incluso mostrando una estructura muy desintegrada (Figura 8). Por otro lado, los resultados obtenidos al aplicar un ANOVA revelan que existen diferencias significativas en termino de análisis grupal ( $p < 1 \times 10^{-9}$ ), pero por otro lado el análisis comparativo entre las muestras solo permite definir que a partir del tratamiento con 50  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tiene diferencias significativas ( $p < 0,003$ ). Aún así es posible evidencias una tendencia correlativa entre el aumento de la activación celular y la dosis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que fue incorporada a los cultivos (Figura 7). Por lo que, es posible decir que la activación microglial aumenta en forma proporcional al aumento en las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esto apoya la idea que en el organismo, el daño provocado por la acumulación de componentes oxidativos a lo largo de la vida, puede conllevar a la activación y sobre activación de las células microgliales en la medida que se acumulan componentes de estrés oxidativo en el entorno celular.

Esto resulta significativo considerando la hipótesis de estudio de este seminario de título, ya que en la Hipótesis Neuroinmunomoduladora (Fernández y col. 2008; Maccioni y col, 2009b), uno de los agentes involucrados en el desarrollo de la patogénesis de la EA es la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en el tiempo (von Bernhardi 2005). De esta forma la evidencia presentada por la activación microglial en presencia de  $H_2O_2$ , es una forma de correlacionar el evento “señal de daño tipo estrés oxidativo” con el efecto “inducción de la neurodegeneración” por medio de la sobre activación microglial.

#### **4.3 Purificación y agregación de proteína tau.**

Si bien la metodología para la purificación de la proteína tau estuvo basada en lo descrito por Farias y col.1992, se hicieron algunas modificaciones con el fin de optimizar la cantidad y el grado de pureza de proteína obtenida. Se aprovecharon algunas de las características de la proteína tau, como su resistencia a altas temperaturas y a condiciones ácidas. Parte de su purificación se basó en incubar el homogenizado por más tiempo a altas temperaturas y al tratamiento ácido con tampón de homogenización de microtúbulos pH 2,5. Cabe recordar que las etapas críticas en la purificación de la proteína tau residen en la delicada secuencia de ciclos de polimerización y despolimerización (Maccioni y col, 1988), procedimientos sumamente sensibles a los cambios de temperatura, lo que explica la diferencia entre las temperaturas utilizadas en el protocolo de purificación (37°C y 4°C).

#### **4.4 Efecto de la proteína tau en células microgliales.**

En la exposición de las células microgliales a proteína tau se consideró el uso de la proteína en dos estados monomérico y agregado. Esto por que en condiciones fisiológicas normales las células neuronales contienen proteína tau monomérica en el citosol (Mandelkow y col, 2007) lo que le permite su papel en la dinámica normal de polimerización y despolimerización de los microtúbulos (Gonzalez y col, 1998; Avila y col, 2004). Por otro lado en condiciones patológicas, como la EA, la proteína tau se encuentra en las neuronas formando agregados proteicos insolubles y altamente tóxicos (Gonzalez y

col, 1998; Maccioni y col, 2001; Avila y col, 2004; Mandelkow y col, 2007; Gómez-Ramos y col, 2006). Estos agregados proteicos facilitan la auto-agregación de la proteína y finalmente conducen a la neurodegeneración, siendo liberados al medio extracelular cuando ocurre la neurodegeneración (Gómez-Ramos y col, 2006).

Las concentraciones utilizadas en la exposición de las células microgliales a proteína tau, tanto en el caso de proteína tau monomérica como proteína tau agregada, estuvieron basadas en el rango de concentraciones utilizadas por Gómez-Ramos y col. (2006) en su trabajo con neuronas expuestas a proteína tau extracelular. En su trabajo se observaron efectos tóxicos para las neuronas en un rango de 0 a 5  $\mu\text{M}$ , pero considerando las que las microglías son células altamente sensibles a los cambios en la homeostasis del microambiente neuronal en este trabajo se amplió el rango de concentraciones de experimentación de 0,5 a 50  $\mu\text{M}$ .

Los cultivos microgliales fueron en un principio expuestos durante 24 y 48 horas a la proteína tau. Los resultados de 24 horas de exposición (que no se muestran) evidenciaban algunos cambios y efectos en los cultivos celulares pero no resultaron ser claros. Los resultados obtenidos a las 48 horas de exposición resultaron ser mucho claros en el efecto de la proteína tau sobre las células y por ello se utilizó este intervalo de tiempo de exposición de los cultivos al agente de estrés.

#### **4.4.1 Proteína tau monomérica.**

Los resultados obtenidos al exponer los cultivos microgliales a proteína tau monomérica mostraron un patrón de activación errático sin presentar una tendencia definida (Figura 10). Al realizar un ANOVA de los datos en forma grupal estos presentaron una diferencia significativa aproximada a un 0,1%, lo que difiere enormemente de lo observado en el caso anterior (donde el valor de p en el análisis grupal era menor a un  $1 \times 10^{-9}$ ). Al momento de revisar las diferencias significativas entre las muestras se obtuvo que estas no presentaron una diferencia significativa, salvo al comparar la dosis de proteína tau 1  $\mu\text{g/ml}$  con la de 50  $\mu\text{g/ml}$  que tuvieron un 3%, lo que invita a repetir la curva de

estudio ya que a su vez, estos valores no tendrían diferencias significativas con las dosis intermedias (5 y 10  $\mu\text{g/ml}$  de proteína tau). Al estudiar estos resultados desde el cálculo del porcentaje de activación (Figura 11) es posible notar que este no supera el 20% de la activación basal. Por otro lado se observan valores negativos de activación lo cual podría sugerir que la proteína monomérica podría funcionar con efectos protectores o inhibitorios de la activación, pero dado que las diferencias no son significativas (según los resultados arrojados por el ANOVA) esta hipótesis es descartable y solo apoya la invitación a repetir el experimento.

#### 4.4.2 Proteína tau agregada.

Los resultados obtenidos al exponer los cultivos microgliales a proteína tau agregada evidencian una tendencia al aumento de la activación celular en relación con la concentración de proteína tau agregada, lo que fue observable en la medición de nitritos en el medio extracelular, los cambios morfológicos y el análisis estadístico (Figura 12 y 13). Al realizar un ANOVA de las muestras en forma grupal el valor de  $p$  es del orden de  $10^{-6}$  lo que evidencia que en términos de análisis grupal las diferencias son significativas. Sin embargo al revisar el análisis entre las muestras estas revelan que sólo la dosis de 50  $\mu\text{g/ml}$  de proteína tau tiene diferencias significativas reales con respecto a las otras dosis utilizadas ( $p < 0,04$ ). A pesar de esto es posible observar que la activación tiene una tendencia al aumento en función del aumento de la dosis de proteína tau agregada (Figura 13). La inmunofluorescencias realizadas potencian esta información al observar los cambios morfológicos asociados al aumento de la dosis de proteína tau en el cultivo celular (Figura 14), la cual revela el cambio morfológico sufrido por la células microglial, que se traduce en el paso de un estado inactivo a otra muy activado (Figura 1).

Se ha descrito por Colton y Wilcock (2010), así como por Kettenmann (2006), que la activación microglial conlleva drásticos cambios morfológicos, en donde la microglia pasa de un estado inactivado y altamente ramificado a uno activado y ameboideo, con ausencia de ramificaciones, e induce la liberación de sustancias citotóxicas. Los resultados observados en las inmunofluorescencias reflejan los cambios morfológicos asociados a la



activación (Figura 14). En la medida que aumenta la concentración de proteína tau agregada que es incorporada en los cultivos se puede observar como la célula se expande y pierde sus prolongaciones, lo que se puede observar en la Figura 14. Esto apoya la activación detectada molecularmente por la medición de la concentración de nitritos en el medio extracelular.

El exponer los cultivos microgliales a proteína tau agregada se debe considerar la activación provocada por el agente de inducción a la agregación de la proteína tau, en este caso heparina disuelta en buffer Mes-Glicerol. En este caso se utilizó una solución de heparina a una concentración de 0,1  $\mu\text{M}$  disuelta en buffer Mes-Glicerol, ya que corresponde a una aproximación de la concentración de heparina más alta a la que son expuestas las células, por que esta contenida en la solución de mayor concentración de proteína tau agregada. El registro obtenido en la medición de nitritos en el medio extracelular de las células expuestas a heparina prácticamente duplicaba la concentración de nitritos extracelulares obtenida en el caso de los controles con  $\text{H}_2\text{O}$  estéril y con Tampón de Homogenización (Mes-Glicerol), como se ve reflejado en la Figura 12. Se debe considerar además que la concentración obtenida es muy cercana a lo registrado en las células expuestas a 50  $\mu\text{M}$  de proteína tau agregada, sugiriendo que la concentración de nitritos extracelulares obtenida a esa concentración de proteína tau puede ser efecto de la heparina más que de la propia proteína tau. Es por esto, y dados los rangos de error asociados a la medición que fue necesario verificar si era significativa la diferencia entre las mediciones de exposición a heparina y a proteína tau 50  $\mu\text{M}$ . Mediante la aplicación comparativa del ANOVA, se verificó que ambos registros eran significativamente diferentes, por lo que la activación observada por el efecto de la proteína se presume independiente de lo obtenido en el caso de la exposición a heparina. Sin embargo, la heparina es un agente activador de las células por lo que deberá ser eliminado como agente de inducción a la agregación de la proteína tau para el efecto de este tipo de ensayos experimentales, debiendo buscar otra metodología de agregación para la proteína donde el agente utilizado no provoque la activación de las células o bien la mantenga dentro de los rangos basales de activación, para este caso cercanos a lo registrado con el buffer Mes-glicerol.

## 5. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

En la actualidad la EA se puede explicar como un desorden neurodegenerativo asociado a numerosas formas de daño que determinan en último término la activación de mecanismos de neurinmunoinflamación, que a su vez se encuentran directamente relacionados con la activación microglial y la liberación de elevados niveles de citoquinas proinflamatorias (Griffin y col, 1998; Desai y col, 2009; Morales y col, 2010b).

Por otro lado, la activación microglial es un proceso diverso fenotípica y funcionalmente, ya que ésta respuesta está sujeta al tipo de estímulo, a la intensidad de éstos y el contexto en que éstos se dan, y es por esto que no necesariamente será una respuesta nociva, pues en una primera instancia, puede tener características neuroprotectoras (Hanisch y Kettenmann 2007; Morales y col, 2010b). Es, por lo tanto, el balance entre el efecto neurotóxico contra el neuroprotector, así como la relación y balance entre los factores microgliales anti- y pro-inflamatorios, lo que determina el papel que juega la microglia en el desarrollo de una patología o en una condición de daño leve (Li y col, 2007).

Este seminario de título estuvo centrado en una parte del desarrollo experimental de la teoría Neuroimmunomoduladora de la enfermedad de Alzheimer, con el fin de respaldar lo que en ella se plantea y abrir nuevos paradigmas donde enfocar los estudios futuros entorno a la EA. Así, el desarrollo experimental basado en las respuestas posibles de las células microgliales en condiciones de estrés son indudablemente un primer paso de estudio para dilucidar grandes hallazgos asociados a la hipótesis planteada.

Para esto la obtención y estandarización de cultivos microgliales, a partir de un cultivo primario de corteza de rata neonata, fue sin duda el primer objetivo logrado.

La respuesta microglial observada frente al estímulo del tipo estrés oxidativo evidenció una clara activación, respaldado tanto con los experimentos de detección química de la activación (por la medición de nitritos liberados al medio extracelular) como la

observación de cambios morfológicos (a través de las inmunofluorescencias). Como esta descrito en la literatura (Kettenmann 2006; Colton y Wilcock 2010) estos son patrones de activación conocidos y ya establecidos, pero la detección de citoquinas proinflamatorias en el medio celular debe ser un paso a seguir en el estudio de la activación microglial frente a este estímulo, sobre todo si se busca asociar la activación microglial, asociada a un estímulo específico, con la respuesta inmunitaria inflamatoria.

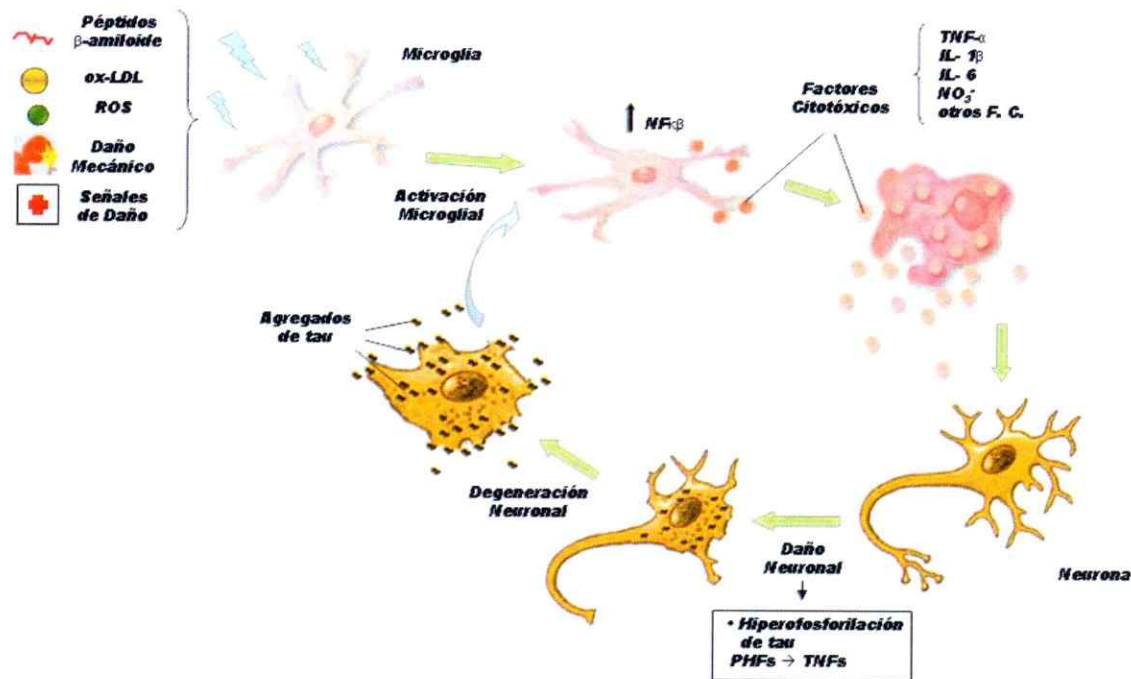
Por otra parte, la proteína tau tiene un papel clave en el desarrollo de la patogénesis de la EA, convirtiéndose en un blanco importante para abordar la enfermedad. Los posibles efectos de la liberación de esta proteína al medio extracelular, una vez que comienzan los procesos neurodegenerativos, es motivo de estudio en la actualidad (Gómez-Ramos y col., 2006, 2008).

Con los resultados obtenidos de la exposición de microglia a proteína tau monomérica no fue posible evidenciar un efecto activador en la microglia. Por otra parte, la inducción *in Vitro* de la agregación de proteína tau y su posterior exposición en los cultivos busca simular la liberación de los agregados proteicos al medio extracelular. Dada la interferencia obtenida al utilizar heparina como agente inductor, es necesario buscar nuevos protocolos de agregación de la proteína que sean más compatibles con las condiciones de trabajo y reducir la brecha de activación microglial obtenida por el agente inductor.

Sin embargo, la proteína tau agregada se muestra como un factor activador de la microglia, dados los resultados obtenidos en los cultivos expuestos a la proteína agregada, evidenciado una clara tenencia al aumento de la activación celular en función de la dosis aplicada a la células. Tal como en el caso representativo del estrés oxidativo, es necesario continuar estos estudios detectando y midiendo la concentración de citoquinas proinflamatorias que diluciden el efecto potenciador de la proteína tau en la cascada inflamatoria asociada a la EA.

De esta forma es posible presumir que tanto el estrés oxidativo como la proteína tau agregada puede ejercer un efecto nocivo cuando están presentes en el medio extracelular, favoreciendo la activación microglial.

Finalmente, la hipótesis propuesta estaría completa una vez que se realicen las mediciones de citoquinas proinflamatorias presentes en los medios extracelulares de cultivos microgliales expuestos a  $H_2O_2$  y a proteína tau agregada. Aun así en este seminario de título fue posible corroborar el efecto de los agregados proteicos de tau inmersos en el medio extracelular, los cuales detonarían la activación microglial, potenciando y actuando como agentes desencadenantes de la cascada proinflamatoria conducentes a la neurodegeneración, lo cual a su vez estaría potenciando cíclicamente la activación microglial conllevando a una sobre activación de las células, las cuales inducirían la activación de células microgliales aledañas así como la neurodegeneración y el deterioro celular (figura 15).



**Figura 15. Modelo de activación microglial conducente a neurodegeneración.**

Células microgliales sensibles a diferentes señales de daño son sobre activadas en el largo plazo, produciendo la secreción de compuestos citotóxicos y proinflamatorios que conducen al daño neuronal. Producida la degeneración neuronal agregados de proteína tau extracelulares retornan el ciclo de sobreactivación microglial (Una versión similar está en Morales y col, 2010b).

**Agradecimientos:** Esta tesis fue financiada por proyectos Fondecyt 1080254 y grant de la Alzheimer's Association, U.S.A. al Dr. Maccioni.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Alzheimer's Association.** 2009. Alzheimer's disease facts y figures. *Alzheimer's & Dementia* 5:234-270.
- Avila J., Lucas J.J., Perez M. y Hernandez F.** 2004. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev.* 84(2):361-84.
- Barrantes A., Sotresc J., Hernando-Pérez M., Beníteza M.J., de Pablo P.J., Baró A.M., Ávila J. y Jiménez J.S.** 2009. Tau aggregation followed by atomic force microscopy and surface plasmon resonance, and single molecule tau-tau interaction probed by atomic force spectroscopy. *Journal of Alzheimer's Disease* 18:141-151.
- Behrens M.I. y Vergara F.** 2007. Cien años de la enfermedad de Alzheimer. La inmunoterapia ¿una esperanza?. *Rev Méd Chile.* 135: 103-110.
- Blennow K., de Leon M.J. y Zetterberg H.** 2006. Alzheimer's disease. *The Lancet* 368: 387-403.
- Bonda D.J., Wang X., Perry G., Nunomura A., Tabaton M., Zhu X. y Smith M.A.** 2010. Oxidative stress in Alzheimer disease: A possibility for prevention. *Neuropharmacology.* Apr 12. [Epub ahead of print].
- Chung S.** 2009. Aberrant phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *BMB report.* 42: 467-474.
- Colton C.A. y Wilcock D.M.** 2010. Assessing activation states in microglia. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets.* 9: 174-191.
- Desai B.S., Schneider J.A., Li J.L., Carvey P.M. y Hendey B.** 2009. Evidence of angiogenic vessels in Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 116(5):587-97.
- Farías G.A., Vial C., y Maccioni R.B.** 1992. Specific macromolecular interactions between tau and the microtubule system. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 112: 81-88.
- Fernandez J.A., Rojo L., Kuljis R.O. y Maccioni R.B.** 2008. The damage signals hypothesis of Alzheimer's disease pathogenesis. *J Alzheimers Dis* 14:329-333.
- Friedhoff P., Von Bergen M., Mandelkow E.-M., Davies P. y Mandelkow E.** 1998. A nucleated assembly mechanism of Alzheimer paired helical filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:15712-15717.

- Gómez-Ramos A., Díaz-Hernández M., Cuadros R., Hernández F. y Avila J.** 2006. Extracellular tau is toxic to neuronal cells. *FEBS Lett.* **580**(20):4842-50.
- Gómez-Ramos A, Díaz-Hernández M, Rubio A, Miras-Portugal MT y Avila J.** 2008. Extracellular tau promotes intracellular calcium increase through M1 and M3 muscarinic receptors in neuronal cells. *Mol Cell Neurosci.* **37**(4):673-81.
- González C., Farías G. y Maccioni R.B.** 1998. Modification of tau to an Alzheimer's type protein interferes with its interaction with microtubules. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* **44**(7):1117-27.
- Griffin W.S., Sheng J.G., Royston M.C., Gentleman S.M., McKenzie J.E., Graham D.I., Roberts G.W. y Mrak R.E.** 1998. Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression. *Brain Pathol.* **8**(1):65-72.
- Hanger D.P., Anderton B.H. y Noble W.** 2009. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med.* **15**: 112-9.
- Hanisch UK y Kettenmann H.** 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci.* **11**:1387-94.
- Hardy J.** 1997. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* **20**:154-159.
- Hirsch EC y Hunot S.** 2009. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?. *Lancet Neurol.* **8**(4):382-97.
- Kettenmann H.** 2006. Triggering the brain's pathology sensor. *Nat Neurosci.* **9**(12):1463-4.
- Lavados M, Guillón M, Mujica MC, Rojo LE, Fuentes P y Maccioni RB.** 2008. Mild cognitive impairment and Alzheimer patients display different levels of redox-active CSF iron. *J Alzheimers Dis.* **2**:225-32.
- Li L, Lu J, Tay SS, Moochhala SM y He BP.** 2007. The function of microglia, either neuroprotection or neurotoxicity, is determined by the equilibrium among factors released from activated microglia in vitro. *Brain Res.* **1159**:8-17.
- Lue L., Brachova L., Walker D.G. y Rogers J.** 1996. Characterization of glial cultures from rapid autopsies of Alzheimer's and control patients. *Neurobiology of Aging.* **3**:421-429.

- Luo XG, Ding JQ y Chen SD.** 2010. Microglia in the aging brain: relevance to neurodegeneration. *Mol Neurodegener.* **24:** 5-12.
- Maccioni RB, Rivas CI y Vera JC.** 1988. Differential interaction of synthetic peptides from the carboxyl-terminal regulatory domain of tubulin with microtubule-associated proteins. *EMBO J.* **7 (7):**1957-63.
- Maccioni R.B., Muñoz J.P. y Barbeito L.** 2001. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Archives of Medical Research* **32:**367-381.
- Maccioni R.B.** 2008. Nuevas avenidas hacia el diagnóstico y tratamiento de los desórdenes cognitivos: Enfermedad de Alzheimer. *Medwave*, Año VIII, N° 11.
- Maccioni R.B., Farias G.A., Rojo L.E., Sekler M.A. y Kuljis R.O.** 2009a. Current Hypotheses and Research Milestones in Alzheimer's Disease. What Have We Learned from the Tau Hypothesis?. Springer : 49-62.
- Maccioni R.B., Rojo L.E., Fernandez J.A. y Kuljis R.O.** 2009b. The role of neuroimmunomodulation in Alzheimer's disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1153:** 240-246.
- Maccioni R.B., Farias G, Morales I y Navarrete L** 2010. The Revitalized Tau Hypothesis on Alzheimer's Disease. *Archives of Medical Research* 1-6. (En prensa).
- Mandelkow E., von Bergen M., Biernat J. y Mandelkow E.M.** 2007. Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* **17(1):**83-90.
- Markesbery W.R.** 1999. The role of oxidative stress in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* **56:**1449-1452.
- Miranda K.M., Espey M.G., y Wink D.A.** 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* **5:**62-71.
- McGeer P.L., Rogers J. y McGeer E.G.** 2006. Inflammation, anti-inflammatory agents and Alzheimer disease: the last 12 years. *J Alzheimers Dis* **9:**271-276.
- McGeer PL, Schulzer M y McGeer EG.** 1996. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies. *Neurology* **47:** 425-432.
- Meda L, Baron P y Scarlato G.** 2001. Glial activation in Alzheimer's disease: the role of Abeta and its associated proteins. *Neurobiol Aging.* **22(6):**885-93..



- Morales I., Farias G. y Maccioni R.B.** 2010a. Neuroimmunomodulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuroimmunomodulation* 17(3):202-4.
- Morales I., Farias G. y Maccioni R.B.** 2010b. La neuroinflamación como factor detonante del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. *Revista Chilena de Neuropsiquiatria*. p. 1-9 (en prensa).
- Mrak RE.** 2009. Neuropathology and the neuroinflammation idea. *J Alzheimers Dis.* 18: 473-481.
- Ramirez-Expósito M.J. y Martínez-Martos J.M.** 1999. Modificaciones morfológicas y funcionales de la microglia en respuesta a procesos neurodegenerativos en el sistema nervioso central. *Arch Neurocién (Mex)*. 4:21-34.
- Rojo L.E., Fernández J.A., Maccioni A.A., Jiménez J.M. y Maccioni R.B.** 2008. Neuroinflammation: implications for the pathogenesis and molecular diagnosis of Alzheimer's disease. *Archives of Medical Research* 39:1-16.
- Rojo L.E., Sjöberg M.K., Hernández P., Zambrano C. y Maccioni R.B.** 2006. Roles of cholesterol and lipids in the etiopathogenesis of Alzheimer's disease. *J Biomed Biotechnol Pages* 1-17.
- Streit WJ, Miller KR, Lopes KO y Njie E.** 2008. Microglial degeneration in the aging brain--bad news for neurons?. *Front Biosci.* 13:3423-38.
- Town T.** 2010. Inflammation, immunity, and Alzheimer's disease. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets.* 9:129-131.
- Venneti S, Wiley CA y Kofler J.** 2009. Imaging microglial activation during neuroinflammation and Alzheimer's disease. *J Neuroimmune Pharmacol.* 4(2):227-43.
- von Bernhardt R.** 2005. Mecanismos neurobiológicos de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Chil Neuro-psiquiat.* 43(2):123-132.
- von Bernhardt R. y Eugenio J.** 2004. Microglial reactivity to beta-amyloid is modulated by astrocytes and proinflammatory factors. *Brain Res* 1025:186-193.
- Weiner H.L. y Frenkel D.** 2006. Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Nature Reviews* 6:404-416.
- Willis L.M., Bielinski D.F., Fisher D.R., Matthan N.R. y Joseph J.A.** 2010. Walnut Extract Inhibits LPS-induced Activation of Bv-2 Microglia via Internalization of TLR4: Possible Involvement of Phospholipase D2. *Inflammation*. [Epub ahead of print].

## 7. ANEXOS

En el transcurso de este seminario de título se lograron con autoría de la tesista las siguientes publicaciones vinculadas al tema en estudio:

- Neuroimmunomodulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuroimmunomodulation*. 17(3):202-4. Epub 2010 Feb 4. Inelia Morales, Gonzalo Farías y Ricardo B. Maccioni. (revista ISI)
- The Revitalized tau Hypothesis on Alzheimer's Disease. *Archives of Medical Research*. (2010) p.1-5 (en prensa). Ricardo B. Maccioni, Gonzalo Farías, Inelia Morales y Leonardo Navarrete. (revista ISI)
- La neuroinflamación como factor detonante del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. *Revista Chilena de Neuropsiquiatria* (2010) p.1-9 (en prensa). Inelia Morales, Gonzalo Farías y Ricardo B. Maccioni. (revista Scielo)

# Neuroimmunomodulation in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease

Inelia Morales · Gonzalo Farías · Ricardo B. Maccioni

Laboratory of Cellular and Molecular Neurosciences (LCMN), Faculty of Sciences and International Center for Biomedicine (ICC), Ñuñoa Santiago, Chile

## Key Words

Neuroinflammation · Microglia cells · Cellular signaling · Neuroprotection · Alzheimer's disease

## Abstract

Evidence has been cumulated on the role of microglia cells deregulation and alterations in their interaction patterns with brain neurons, in the pathway towards neurodegeneration in Alzheimer's disease (AD). After the failure of the amyloid hypothesis to explain AD pathogenesis, current hypotheses focus on tau self-polymerization into pathological oligomers and filaments as a major culprit for neurofibrillary degeneration. It is worth pointing out that formation of tau polymers is consistent with the clinical and neuropathological observations, and that tangles are pathognomonic of AD and related tau disorders. In this context, inflammatory processes play a major role in neuronal degeneration. On the basis of studies on microglia and neuronal cultures, together with experiments in animal models, and the clinical evidence, we postulated that a series of endogenous damage signals activate microglia cells, inducing NF $\kappa$ - $\beta$  with the consequent release of cytokine mediators such as TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$ . An overexpression of these mediators may trigger signaling cascades in neurons leading to activation of protein kinases gsk3 $\beta$ , cdk5, abl kinases, along with inactivation of phosphatases such as PP1, with the resulting hyperphosphorylation and self-aggregation of tau protein into neurotoxic oligomeric species.

Copyright © 2010 S. Karger AG, Basel

## Introduction

Increasing evidence has been cumulated that neuro-immune networks contribute to the maintenance of neurogenesis [1]. The microglia (brain immune cells) and neuronal cells are directly involved in this process. Under normal physiological conditions, cytokines and chemokines are involved in brain repair and recovery. Cross talk between inflammatory mediators and neural stem cells appears to be critical for neural development. In addition, microglia supports neural stem cell renewal, migration and lineage specification. Precise control of proliferation and differentiation of multipotent stem cells is crucial for the development of the central nervous system (CNS) as well as for adult brain repair [2]. However, deregulation of the cross talks between microglia and neuronal cells occurs upon overactivation of microglia cells [3]. We postulated that this overactivation (fig. 1) appears to be a result of multiple damage signals, e.g. iron overload, oxidative stress molecules,  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) oligomers, low-density lipoprotein components of human plasma, ischemia, brain trauma, etc. [4, 5]. These factors promote erroneous signaling cascades in microglia cells, via RAGE, toll-like receptor 4 (TLR4) and several other glial receptors, thus inducing proinflammatory cytokine production. Cytokines and chemokines are important neuroinflammatory mediators, whose overexpression results from these damage signals that trigger Alzheimer's disease (AD) [6].

**KARGER**

Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail [karger@karger.ch](mailto:karger@karger.ch)  
[www.karger.com](http://www.karger.com)

© 2010 S. Karger AG, Basel  
1021-7401/10/0173-0202\$26.00/0

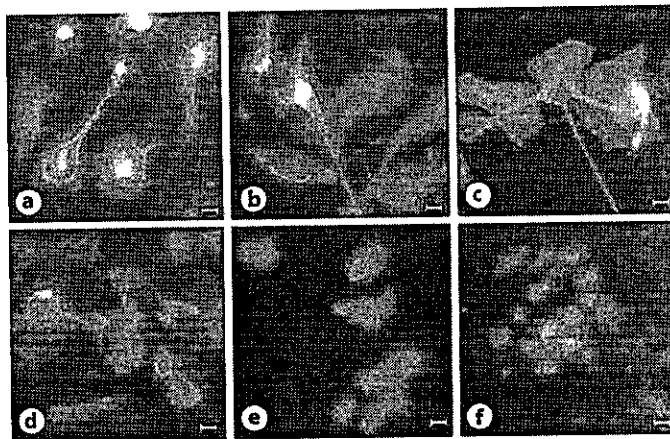
Accessible online at:  
[www.karger.com/nim](http://www.karger.com/nim)

Prof. Dr. R.B. Maccioni  
LCMN, Edificio Milenio  
Las Encinas 3370  
Ñuñoa Santiago (Chile)  
Tel. +56 2 978 7228, E-Mail [rmaccioni@manquehue.net](mailto:rmaccioni@manquehue.net)

## Alzheimer's Disease Is a Disorder of the Innate Immune System

Microglia cells are normally beneficial for brain function. Helpful actions include phagocytosis and killing pathogens. However, when overactive (fig. 1), they have harmful actions including excess production of oxygen free radicals, complement proteins, inflammatory cytokines, prostaglandins, glutamate and many as yet unidentified products. We postulate that the major driving force in AD is neuroinflammation, by activation of the innate immune system. In this context, AD is an auto-toxic disorder. This type of disorders affects mainly the elderly, as a difference from autoimmune diseases that involve the adaptive immune system and strike the young. In this context, a series of danger signals, as indicated above, trigger the inflammatory cascade. Considering the foregoing, we have postulated the neuroimmunomodulation hypothesis for AD pathogenesis, which integrates the triggering factors with innate immunity response, and their effects on neuronal cells [6]. Proinflammatory cytokines signal through different neuronal receptors, thus activating protein kinases involved in tau hyperphosphorylation – like cdk5 and its activator p35 – with the subsequent tau modifications, conformational changes and initiation of the self-aggregation process [5, 6]. Self-polymerized tau oligomers appear as a neurotoxic agent in the pathway toward neuronal degeneration. This hypothesis is supported by cellular and molecular evidence [7] as well as by extensive clinical data indicating that long treatments with anti-inflammatory drugs reduce the risk of AD [8]. Moreover, studies in our laboratory with activated rat microglia cells in primary cultures showed that cytokine-containing conditioned media from these cells promote degeneration, as well as tau hyperphosphorylation, of cultured hippocampal neurons obtained from rat embryos.

Among microglial receptors tagged by damage signals are the innate immune receptor TLR4, a pattern recognition receptor. Its function within the CNS has been recently expanded as new data suggests its influence on microglia activity. TLR4 is expressed primarily on microglia, where it can affect neurons upon activation and subsequent cytokine production. Its expression and signaling activities vary widely under pathological conditions, as evidenced in studies of ischemic stroke, AD and neuropathic pain. This receptor is known for its capacity to detect lipopolysaccharide (LPS), and it responds to endogenous signals of cellular damage. Damage signals such as A $\beta$  but also opioids have recently been reported



**Fig. 1.** Activation of microglia cells in primary culture by ascending concentrations of hydrogen peroxide and LPS. **a** = Control, **b-e** = 1, 10, 100, 400  $\mu$ M H $_2$ O $_2$ , **f** = 1  $\mu$ g/ml LPS. Immunofluorescence with anti-isolectin antibody specific for microglia and falloidin which specifically tag the actin cytoskeleton. A modification in cellular morphology, in which microglia cells turn from a resting, branched morphology to an amoeboid state, can clearly be appreciated in relation to activation after exposure to noxious stimuli. Bars = 5  $\mu$ m.

to induce TLR4 signaling. This protein has been crystallized, providing clues on its mechanism of action. These exciting discoveries have highlighted the new functional aspects on TLR4 signaling [9], thus facilitating potential transfer of this knowledge into drug developments for AD and other brain disorders.

### Microglial Activation and Anomalous Neuronal Signaling Cascades

Microglia cells are the representatives of the immune system in the CNS, and thus are related to immune response and homeostasis. These cells may remain inactivated for long periods of time, and suddenly change their behavior due to its high sensitivity for various signals from their brain environment. When a physiological or pathological stimulus is sensed, cells are capable of migrating to the area of injury, become activated and phagocytic brain macrophages, representing a system of defense and neuroprotection. This transformation is regulated and accompanied by diverse cytokines (mostly proinflammatory) and cytotoxic molecules (free radicals of oxygen, nitric oxide, complement factors, etc.) that allow communication with other inactivated microglia, and with brain and immune system cells. On the other hand, neurons respond

to activated microglia cells with different types of signals.

Pathologies such as AD and other related degenerative brain disorders appear to arise when the damage signals inducing microglia cell activation act in a sustained fashion over long periods of time [6], causing the overactivation of microglia (fig. 1) and the excessive secretion of pro-inflammatory cytokines and cytotoxic molecules that finally leads to damage in brain tissue.

Thus, a series of innate damage signals that would be involved in detonating the activation of microglia have been described [5]. These signals include AGES, HMBG1, S-100 proteins, A $\beta$  peptide oligomers (but not the fibrillar aggregates), which activate microglia via RAGE receptor. Furthermore, oxidized low-density lipoprotein activates the TLRs receptors, particularly TLR4, thus inducing activation. Other signs of damage such as mechanical damage and damage caused by oxyradicals also induce the production of A $\beta$  oligomers, AGE and S-100 protein, which contributes to the process of microglial activation [5].

All these signs of damage trigger alarm mechanisms in the innate immune system, resulting in microglial activation, starting with an increase in the activity of the transcription factor NF $\kappa$ - $\beta$ , which in turn induces an increased production of the cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  [for details, refer to ref. 5]. Excessive release of these cytokines results in a local inflammatory response and neuronal degradation.

In neuronal cells, the effects of TNF- $\alpha$  have not been associated with any particular phenomenon of neuropro-

tection, but an effect of this cytokine in decreasing the activity of cdk5, under specific cell conditions, has been observed. Furthermore, IL-6 induces hyperphosphorylation of tau protein by interfering in the regulation of cdk5/p35 complex by increasing the intraneuronal concentration of cdk5. IL-6 also activates the JAK/STATs and MAPK-p38 systems [10]. IL-6 role in neuroinflammation and neurodegeneration has also been associated with an effect on cognitive impairment.

IL-1 $\beta$  is also involved in regulating the cdk5/p35 complex, and also induces the production of nitric oxide in the hippocampal neuronal cells, which is closely related to cell death [3].

Therefore, the effects of microglia overactivation can be summarized in the excessive release of pro-inflammatory cytokines, which generate changes in the intraneuronal regulation, most of which converge in the alteration of tau protein. These alterations lead to profound changes in the neuronal dynamics and metabolism and subsequent cell death. As a result of deregulation of neuron-microglia cross-talks, neurons also respond to restore regulatory patterns, until the inflammatory driving force results in neuronal degeneration.

#### Acknowledgements

Research has been supported by grant RG-081-91219 from the Alzheimer's Association, USA, and Fondecyt 1080254.

#### References

- 1 Kempermann G, Chesler EJ, Lu L, Williams RW, Gage FH: Natural variation and genetic covariance in adult hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:780-785.
- 2 Battista D, Ferrari CC, Gage FH, Pitossi FJ: Neurogenic niche modulation by activated microglia: transforming growth factor beta increases neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 2006;23:83-93.
- 3 Rojo L, Fernández J, Maccioni AA, Jimenez J, Maccioni RB: Neuroinflammation: implications for pathogenesis and molecular diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch Med Res* 2008;39:1-16.
- 4 Lavados M, Guillón M, Mujica C, Rojo L, Fuentes P, Maccioni RB: Mild cognitive impairment and Alzheimer patients display different levels of Redox-active CSF iron. *J Alzheimer's Dis* 2008;13:225-232.
- 5 Fernandez J, Rojo L, Kuljis R, Maccioni RB: The damage signals hypothesis of Alzheimer's disease pathogenesis. *J Alzheimer's Dis* 2008;14:329-333.
- 6 Maccioni RB, Fernandez J, Rojo L, Kuljis R: Neuroimmunomodulation in Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* 2008;1153:240-247.
- 7 Orellana D, Quintanilla R, Maccioni RB: Neuroprotective effect of TNF alpha against the beta-amyloid neurotoxicity mediated by CDK5 kinase. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:254-263.
- 8 McGeer PL, Schulzer M, McGeer EG: Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies. *Neurology* 1996;47:425-432.
- 9 Covacu R, Arvidsson L, Andersson A, Khadem M, Erlandsson-Harris H, Harris RA, Svensson MA, Olsson T, Brundin L: TLR activation induces TNF-alpha production from adult neural stem/progenitor cells. *J Immunol* 2009;182:6889-6895.
- 10 Quintanilla R, Orellana D, Gonzalez-Bilbault C, Maccioni RB: Interleukin-6 induces Alzheimer's phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway. *Exp Cell Res* 2004;295:245-257.

OPINION

The Revitalized Tau Hypothesis on Alzheimer's Disease

Ricardo B. Maccioni, Gonzalo Farías, Inelia Morales, and Leonardo Navarrete

Laboratory of Cellular and Molecular Neurosciences, Faculty of Sciences, University of Chile & International Center for Biomedicine (ICC),  
Edificio Milenio, Las Encinas, Ñuñoa, Santiago, Chile

Received for publication February 19, 2010; accepted March 1, 2010 (ARCMED-D-10-00083).

Many hypotheses have been raised regarding the pathophysiology of Alzheimer's disease (AD). Because amyloid beta peptide (A $\beta$ ) deposition in senile plaques appears as a late, nonspecific event, recent evidence points to tau phosphorylation and aggregation as the final common pathway in this multifactorial disease. Current approaches that provide evidence in favor of neuroimmunomodulation in AD and the roles of tau pathological modifications and aggregation into oligomers and filamentous forms are presented. We propose an integrative model on the pathogenesis of AD that includes several damage signals such as A $\beta$  oligomers, oxygen free radicals, iron overload, homocysteine, cholesterol and LDL species. These activate microglia cells, releasing proinflammatory cytokines and producing neuronal degeneration and tau pathological modifications. Altered and aggregated forms of tau appear to act as a toxic stimuli contributing to neurodegeneration. Recent findings provide further support to the central role of tau in the pathogenesis of AD, so this protein has turned into a diagnostic and therapeutic target for this disease. © 2010 IMSS. Published by Elsevier Inc.

**Key Words:** Alzheimer's disease, Neuronal cells, Activation of microglia, Proinflammatory factors, Damage signals, Tau phosphorylations, Tau oligomers.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is one of the human disorders that has triggered the largest number of hypotheses to explain its pathogenesis, possibly strengthened by the fact that no cure has yet been found for this devastating disease. Unfortunately, none of these hypotheses accounted coherently for the diversity of the initial events that trigger neurodegeneration and that result in the deposition of senile plaques (SP) and neurofibrillary tangles (NFTs). The most commonly held amyloid hypothesis, prevailing for over two decades, has broken as a result of solid evidence that SP do not account for the complex pathophysiology of AD, and the fact that these structures are not pathognomonic for the disease. Recent findings pointing to unpleated A $\beta$  oligomers as responsible for synaptic impairment are only one among several other damage signals affecting the integrity of brain function. Amyloid deposits thus

appear to be a rather late event and have even been postulated to have a neuroprotective role.

In this context, the early tau hypothesis strengthens in light of observations that tau oligomers are neurotoxic, clinical correlations with tau pathology and the fact that anomalous tau hyperphosphorylations constitute a common final pathway for the different altered molecular signals that affect brain neurons. This raises the question as to precisely what triggers the pathological phosphorylations. We postulated that a series of damage signals that include, among other factors, A $\beta$  oligomers, oxygen free radicals, iron overload, cholesterol levels in neuronal rafts, LDL species and homocysteine trigger, by innate immunity, the activation of microglial cells with the consequent release of proinflammatory cytokines that modify neuronal behavior through anomalous signaling cascades that finally promote tau hyperphosphorylation. Tau modifications lead to its oligomerization and the long-term production of NFTs. As a result of neuronal death, oligomeric forms and tau filaments are released to the extracellular environment, contributing to activation of microglial cells and stimulating the deleterious cycle leading to progressive neuronal degeneration.

Address reprint requests to: Dr. R.B. Maccioni, Laboratory of Cellular and Molecular Neurosciences, Universidad de Chile, Edificio Milenio, Las Encinas 3370, Ñuñoa, Santiago, Chile; Phone: 562-978-7228; E-mail: rmaccioni@manquehue.net or <http://www.ricardomaccioni.com>

### The Tau Protein in AD

More than a century ago, the discovery by Alois Alzheimer of NFTs in the brains of patients with the neurodegenerative disorder named after him (Alzheimer's disease, AD) provided the basis for a significant amount of studies to elucidate the molecular, cellular and genetic features of this disease (1–3). However, the discovery that the protein components of NFTs and the paired helical filaments (PHFs) were hyperphosphorylated forms of tau was achieved only during the 1980s (4). Many studies have improved our understanding of tau hyperphosphorylation, changes in tau interaction patterns with microtubules, and alteration of the neuronal cytoskeleton (5,6), whereas recent reports have shed light on the mechanisms of tau self-polymerization.

AD is a multifactorial disorder in which protein alterations, oxidative stress, neuroinflammation, immune deregulation, impairment of neuronal–glial communication, and neurotoxic agents appear among factors triggering neuronal degeneration, and the balance among these may vary from patient to patient. Although diverse, these factors induce deleterious signaling through different sets of neuronal receptors that finally converge in the hyperphosphorylation of tau molecules.

Structural studies, together with the elucidation of the signaling cascades in neurodegeneration, led us to postulate a hypothesis based on the concept that tau hyperphosphorylation constitutes a final common pathway in AD pathogenesis, upon which a host of signaling mechanisms converge, and that this phenomenon precedes widespread neuronal degeneration (7–9). In this context, the tau hypothesis is based on converging neurobiological studies (10–12) and clinical data sets (13,14). Actually, increasing evidence indicates that the tau hypothesis provides the closest approximation to clinical observations on AD patients. Among these, (i) severity on this type of dementia correlates well with the increasing accumulation of NFTs in the brain (3,13), (ii) the high correlation between the hyperphosphorylated tau species in the cerebrospinal fluid (CSF) of AD patients with the extent of cognitive impairment (14) and (iii) that a decrease in tau filaments by target-directed drugs alleviate cognitive impairment (15).

The establishment of an experimentally testable unifying hypothesis on AD is the basis on which to build innovative diagnostic and therapeutic approaches. The unchallenged acceptance of the amyloid hypothesis for about two decades (16,17) has led to unsuccessful efforts to generate drugs to control AD because pleated amyloid and senile plaques (SPs) are most probably not the cause of neuronal degeneration (16), and the expectations harbored on anti-amyloid therapies will most likely not materialize. The revised version of the most commonly held amyloid hypothesis (17) rests on the concept that A $\beta$  (1–42) self-polymerizes over years to form SPs, which then trigger subsequent brain lesions. However, SPs are also common in

neurologically healthy individuals and not unique to AD. Unpleated A $\beta$  oligomers (ADDLs) rather than SPs appear to be the elements responsible for synaptic impairment well before the accumulation of fibrillary amyloid (18). On the basis of these findings and evidence of tau filament formation, followers of the tau hypothesis have pointed to the fact that tau aggregation and neurotoxicity associated with the hyperphosphorylated forms constitute common events determinant for the neurodegenerative cascade.

We focus our discussion on the updated tau hypothesis together with our current neuroimmunomodulation concepts that provide a novel unifying hypothesis of AD pathophysiology that account coherently for almost all known facts on AD and point the way for subsequent efforts toward its elucidation. Therefore, information obtained in the process of testing this new hypothesis experimentally will likely be helpful to formulate an innovative AD therapy and to design reliable biomarker strategies for its diagnosis (19). Thus, beyond the classical formulation of the tau hypotheses, the recent postulates on the role of neuroimmunomodulation changes in the pathogenesis strengthen the idea that damage signals activate microglia, which in turn overproduce proinflammatory cytokines that trigger deleterious signal cascades in neuronal cells (8) with deregulation of protein kinases and phosphatases controlling tau phosphorylations and the consequent neurofibrillary degeneration. As a result of neuronal death, tau oligomeric species are released into the extracellular environment, thus contributing to microglial activation and providing positive feedback on the deleterious cycle that lead to progressive degeneration of neurons in AD brains (20).

### Anomalous Signaling and Tau Hyperphosphorylation and Oligomerization

The low molecular weight microtubule-associated protein (MAP) tau is the major component of the MAPs in axons and plays critical roles in stabilizing microtubules and inducing its own assembly (6). However, under pathological conditions tau self-aggregates into PHFs, which turn into the NFTs during the course of AD, a neuropathological hallmark of AD and tauopathies (21,22). Recent studies indicate that hyperphosphorylated tau oligomers exert pathological effects, triggering neurotoxic actions that affect the normal interaction patterns of the neuronal cytoskeleton (23). Pathological tau oligomerization seems to correlate with cognitive impairment (24). Important advances toward our understanding on *in vitro* tau polymerization have contributed to clarify the molecular mechanisms (25–27) even though the structural transitions from the native conformation of tau to its neurotoxic polymers remains to be elucidated.

It has been shown that polyanions that promote PHF aggregation as well as microtubules interact with tau through positive charges near the ends of tau repeats (28) and through the  $\beta$ -structure forming-motifs at the beginning

180  
181  
182  
183  
184  
185  
186  
187  
188  
189  
190  
191  
192  
193  
194  
195  
196  
197  
198  
199  
200  
201  
202  
203  
204  
205  
206  
207  
208  
209  
210  
211  
212  
213  
214  
215  
216  
217  
218  
219  
220  
221  
222  
223  
224  
225  
226  
227  
228  
229  
230  
231  
232  
233  
234

of repeats 2 and 3. The binding nature of polyanions supports the hypothesis that stable microtubules prevent PHF formation by blocking tau-polyanion interaction sites, which are crucial for anomalous PHF formation (29). Moreover, tau oligomers with a prefilamentous structure appear to play a role at early stages of AD and tauopathies but also in asymptomatic patients with Braak-stage I neuropathology where clinical symptoms of AD and NFTs in frontal cortex are absent. This suggests that an increase in tau oligomers occurs before individuals manifest clinical symptoms of AD. Interestingly, ligands of the family of quinolines and derivatives with high affinity for tau oligomers control tau polymerization (30), thus offering an avenue toward generation of potential tau-aggregation inhibitory drugs for treatment of AD.

Research on the pathophysiology of the major molecular factors triggering AD has provided clues on the structural-functional underpinnings of tau-tau interactions (31) as well as on the links between A $\beta$  production and tau hyperphosphorylations (32,33). According to our unifying hypothesis—built on the role of tau as a final common effector pathway—abnormal signaling leading to degenerative processes starts with the continuous activity of individually variable factors such as oxidative agents (34), iron overload (35), disorders of lipid metabolism, hyperglycemia, deregulation of insulin levels (36), chronic infections, head trauma, and others (8). These factors are likely to activate endogenous alarm signals that trigger anomalous cellular signaling cascades in microglial cells and astrocytes (Figure 1).

In turn, activated glial cells respond by releasing NF- $\kappa$ B and overproduce proinflammatory cytokines (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ), thus leading to brain inflammation (37) and serious alterations in neuron-glia interaction patterns (20,38). Interestingly, overproduction of IL-6 activates the JAK/Stat system via IL-6 and/or NMDA receptors, which in turn activates MAP kinases, thus promoting the activity of transcription factor Egr-1 that increases p35 expression. This latter effect results in the activation of cdk5 protein kinase involved in neuronal development (32) with subsequent tau hyperphosphorylation. Activation of the kinase p38 also results in tau hyperphosphorylations (39). Moreover, IL-6 and TNF $\alpha$  also activate specific neuronal receptors, inducing cell cycle activity without proliferation. One of the critical kinases involved in neuronal development, cdk5, is deregulated in AD according to *in vitro* evidence, studies in animal models with tau pathology (33), and studies in the human brain. Hence, deregulation of cdk5 results in tau hyperphosphorylation at Ser 202 and Thr 205. Inhibitors of cdk5 control tau hyperphosphorylation, neuronal degeneration, and neuronal death. Thus, deregulation of the sensitive equilibrium between protein kinases and phosphatases is critical in the degenerative phenotype of neurons (34).

Anomalous cascades mediated by tau hyperphosphorylations have also been reported in several pathological pathways in neurons such as p75 activated by an excess of NGF (or

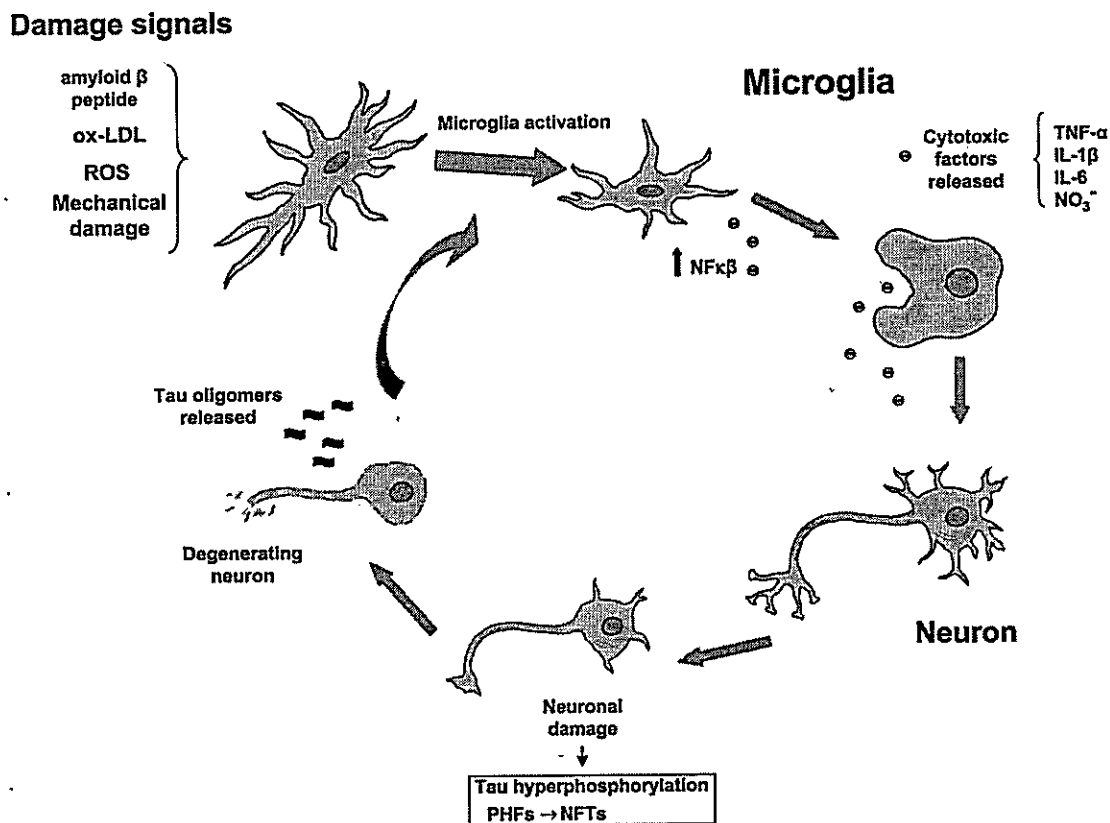
altered processing of NGFs) produced by A $\beta$ -activated astrocytes (40), NO effects (41), direct action of A $\beta$  oligomers on neuronal synapses, toxicity of advanced glycation end-products (AGEs) via AGEs receptors (RAGEs) (42), downstream the degenerative cascade where hyperphosphorylated tau appears to be a final common pathway for neuronal degeneration associated with AD. Hyperphosphorylated tau species and other modified tau variants have the tendency to self-aggregate. Thus, a long-term process of anomalous tau modifications and aggregation will affect neuron function and eventually will result in neuronal death with the consequent release of tau oligomeric species and filaments. This, in turn, triggers microglia activation. In this context, through a positive feedback mechanism, anomalous tau-induced activation of microglia cells will re-activate the cycle leading to activation of the inflammatory cascade (20,30) with the subsequent death of neuronal populations (Figure 1). This evidence provides further support to the tau hypothesis and the scientific background to build future therapeutic avenues based on the inhibition or the disassembly of tau filaments.

#### Tau Filaments as Therapeutic Targets for AD

The characteristic qualitatively abnormal hyperphosphorylation of tau is the common denominator of all tauopathies and AD (43). In transgenic mice, the onset of pathology and functional impairment is not evidenced prior to the emergence of this biochemical hallmark. This suggests that with or without mutations on tau, it is the hyperphosphorylation and subsequent tau aggregation that converts a latent problem into active pathology during aging. Inhibition of this process is therefore highly plausible to prevent, retard, or possibly reverse—even partially—AD. Even though transgenic models of tauopathy based on tau mutations have been available since the year 2000, only few reports of their use for therapeutic purposes have been published. Focusing on abnormal conformations of mutant tau, hsp90 inhibitors have been tested in the JNPL3 mouse model with spinal cord pathology and motor phenotype (44). Inhibition of heat-shock protein (hsp90) leads to reduced chaperone activity and enhanced degradation of the mutant tau over normal tau protein. This leads to reduced formation of sarcosyl-insoluble PHF-tau species, frequently used as a biochemical model to pathologically define NFTs. However, the relationship of these operationally defined species to the overall scope of tau hyperphosphorylation is less certain than generally assumed. It is unclear whether this approach would be viable in the much more frequent tauopathies not driven by tau mutations, where tau levels may be unresponsive to hsp90 inhibition. In view of this concern, mutant tau transgenic models may not be particularly representative for AD in this specific approach. On the other hand, the levels of a host of other proteins not involved in pathology are likely to be affected in view of the normal function of hsp90.

290  
291  
292  
293  
294  
295  
296  
297  
298  
299  
300  
301  
302  
303  
304  
305  
306  
307  
308  
309  
310  
311  
312  
313  
314  
315  
316  
317  
318  
319  
320  
321  
322  
323  
324  
325  
326  
327  
328  
329  
330  
331  
332  
333  
334  
335  
336  
337  
338  
339  
340  
341  
342  
343  
344





**Figure 1.** Model of microglial activation leading to neurodegeneration. Microglia cells sensitive to different damage signals are overactivated in the long term, resulting in an activated, amoeboid phenotype and the secretion of cytotoxic compounds (mainly pro-inflammatory cytokines) leading to neuronal damage and tau hyperphosphorylation and aggregation to form tau oligomers, PHFs and NFTs. When the neuron degenerates tau aggregates are released to the extracellular environment and act as a new damage signal contributing to the deleterious cycle of microglial cells activation.

Other studies using mutant tau transgenic mice directly address inhibition of tau hyperphosphorylation. Because GSK3 $\beta$  has been implicated as a tau kinase, JNPL3 mice were treated with therapeutic levels of lithium, a specific GSK3 inhibitor (45). There was a reduction in pathological markers when applied before the age of symptom onset, but it is questionable whether this was related to GSK3 inhibition in view of the increasing recognition of lithium as an enhancer of autophagy. In any case, a retardation of functional impairment was not seen with this treatment, which corroborates results discussed below that the generally used pathological markers of tauopathy, which biochemically represent downstream products, may not be the dominant toxic tau species. Significant efficacy, even at ages around disease onset, on the level of abnormally hyperphosphorylated tau species as well as for onset and/or progression of motor impairment in the same model was observed with the orally bioavailable and brain-penetrating compound SRN-003-556, exhibiting a broader kinase inhibitory spectrum (46). This compound was developed on the basis of efficacy in cell models of tau hyperphosphorylation induced by the mainly PP2A inhibiting agent okadaic acid, which are the only models where all criteria of PHF-type tau

hyperphosphorylation become manifest. Only inhibitors that include those for ERK2 were active in this model, although inhibition of ERK2 alone was not sufficient. Consequently, SRN-003-556 was optimized with ERK2 as a lead assay, although collateral inhibitory activities are probably relevant as well. An observation in this study was the apparent uncoupling of tau hyperphosphorylation, determined by biochemical means from pathologically assessed NFT counts.

#### Therapies against Tau Aggregation

Considering the theoretical background supporting a neurotoxic role of tau modifications and aggregation in AD, attention has been focused during recent years to tau aggregation inhibition or disassembly as a possible therapeutic approach for AD.

Methylene blue (MB), a phenothiazine compound initially used as an antiseptic and currently approved for treating methemoglobinemia, inhibits tau and A $\beta$  aggregation *in vitro*. In a phase II clinical trial MB (Rember, TauRx Therapeutics, Singapore) significantly improved cognitive functions compared to placebo controls and slowed the

455 progression of AD over the course of a year (47). Other  
456 compounds like anthraquinones (48) and cyanine dyes  
457 (15) were screened for their ability to disrupt tau aggregates  
458 *in vitro* and in cell cultures.

459 In conclusion, AD is a clear example of how the prevailing  
460 conceptual frame regarding pathophysiology of a disease can  
461 affect the resources and efforts invested in the basic investi-  
462 gation and development of diagnostic and therapeutic strate-  
463 gies for such an important disease. Currently, there is  
464 a renewed interest in the role that tau and tau modifications  
465 may play in AD. Studies in this direction have allowed the  
466 design of new strategies for AD diagnosis with molecules  
467 that may allow the specific visualization of tau aggregates  
468 (49) for the treatment of AD and other tauopathies with  
469 inhibitors of tau modification and/or aggregation.

#### 472 Acknowledgments

473 Research was supported by a grant from Fondecyt 1080254 and  
474 the Alzheimer's Association, USA (to RBM).

#### 477 References

- 478 1. Alzheimer A. A singular disorder that affects the cerebral cortex. In:  
479 Hochberg CN, Hochberg FH, eds. *Neurologic Classics in Modern*  
480 *Translation*. New York: Hafner Press;1977. pp. 41–43.
- 481 2. Maccioni RB, Concha I, Otho C, et al. The protein kinase cdk5: struc-  
482 tural aspects, roles in neurogenesis and involvement in Alzheimer's  
483 pathology. *Eur J Biochem* 2001;268:1518–1529.
- 484 3. Maccioni RB, Barbeito L, Muñoz JP. The molecular bases of  
485 Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch*  
486 *Med Res* 2001;32:367–381.
- 487 4. Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ. Microtubule-associated protein tau  
488 (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in  
489 Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:4044–4048.
- 490 5. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, et al. Abnormal phosphorylation of  
491 the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal  
492 pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:4913–4917.
- 493 6. Maccioni RB, Cambiasso V. Role of microtubule-associated proteins in  
494 the control of microtubule assembly. *Physiol Rev* 1995;75:835–864.
- 495 7. Rojo L, Fernandez J, Maccioni AA, et al. Neuro-inflammation: impli-  
496 cations for the pathogenesis and molecular diagnosis of Alzheimer's  
497 disease. *Arch Med Res* 2008;39:1–16.
- 498 8. Fernandez J, Rojo LE, Kuljis RO, et al. The damage signal hypothesis  
499 of AD. *J Alzheimers Dis* 2008;14:329–333.
- 500 9. Maccioni RB, Rojo LE, Fernandez JA, et al. The role of neuroimmu-  
501 nomodulation in Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* 2009;1153:  
502 240–246.
- 503 10. Maccioni RB, Vera JC, Dominguez J, et al. A discrete repeated sequence  
504 defines a tubulin binding domain on microtubule-associated protein tau.  
505 *Arch Biochem Biophys* 1989;275:568–579.
- 506 11. González-Billault C, Fariás G, Maccioni RB. Modification of tau to an  
507 Alzheimer's type protein interferes with its interaction with microtubules.  
508 *Cell Mol Biol* 1998;44:1117–1127.
- 509 12. Fariás G, Gonzalez C, Maccioni RB. Immunological characterization  
of epitopes on tau of Alzheimer's type and chemically modified tau.  
*Mol Cell Biochem* 1997;168:59–66.
13. Ghoshal N, García-Sierra F, Wu J, et al. Tau conformational changes  
correspond to impairments of episodic memory in mild cognitive  
impairment and Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 2002;177:475–493.
14. Maccioni RB, Lavados M, Maccioni CB, et al. Anomalous phospho-  
rylated tau protein and Abeta fragments in the CSF of Alzheimer's  
and MCI subjects. *Neurobiol Aging* 2006;27:237–244.
15. Duff K, Kuret J, Congdon EE. Disaggregation of Tau as a therapeutic  
approach to Tauopathies. *Curr Alzheimer Res* 2010 Jan 21;. [Epub  
ahead of print].
16. Tabaton M, Mandybur TI, Perry G, et al. The widespread alteration of  
neurites in Alzheimer's disease may be unrelated to amyloid  
deposition. *Ann Neurol* 1989;26:771–778.
17. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease:  
progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002;  
297:353–356.
18. Ferreira ST, Vieira MN, De Felice FG. Soluble protein oligomers as  
emerging toxins in Alzheimer's and other amyloid diseases. *Life*  
2007;59:332–345.
19. Maccioni RB, Lavados M, Maccioni CB, et al. Biological markers of  
Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Curr Alzheimers*  
*Res* 2004;1:307–314.
20. Morales I, Fariás G, Maccioni RB. Neuroimmunomodulation in the  
pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuroimmunomodulation* 2010;  
17:202–204.
21. Delacourte A. The natural and molecular history of Alzheimer's  
disease. *J Alzheimers Dis* 2006;9:187–194.
22. Berger Z, Roder H, Hanna A, et al. Accumulation of pathological tau  
species and memory loss in a conditional model of tauopathy. *J Neurosci*  
2007;27:3650–3662.
23. Maeda S, Sahara N, Saito Y, et al. Granular tau oligomers as intermediates  
of tau filaments. *Biochemistry* 2007;46:3856–3861.
24. Maeda S, Sahara N, Saito Y, et al. Increased levels of granular tau  
oligomers: an early sign of brain aging and Alzheimer's disease.  
*Neurosci Res* 2006;54:197–201.
25. Perez M, Arrasate M, Montejo de Garcini E, et al. *In vitro* assembly of  
tau protein: mapping the regions involved in filament formation.  
*Biochemistry* 2001;40:5983–5991.
26. Sibille N, Sillen A, Leroy A, et al. Structural impact of heparin binding to  
full-length tau as studied by NMR spectroscopy. *Biochemistry* 2006;45:  
12560–12572.
27. von Bergen M, Berghorns S, Biernat J, et al. Tau aggregation is driven  
from a transition coil to beta sheet structure. *Biochem Biophys Acta*  
2005;3:1739.
28. Mukrasch MD, Markwick P, Biernat J, et al. Highly turn conforma-  
tions in natively unfolded tau protein identified from residual dipolar  
couplings and molecular simulation. *J Am Chem Soc* 2007;129:  
5235–5243.
29. Avila J, Perez M, Lucas J, et al. Assembly in vitro of tau protein and  
its implications in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimers Res* 2004;1:  
97–101.
30. Maccioni RB. Potential clues toward Alzheimer's disease treatment.  
*Rev Farmacol Chile* 2009;2:34.
31. Jeganathan S, von Bergen M, Mandelkow EM, et al. The natively  
unfolded character of tau and its aggregation to Alzheimer-like paired  
helical filaments. *Biochemistry* 2008;47:10526–10539.
32. Alvarez A, Muñoz JP, Maccioni RB. A cdk5/p35 stable complex  
is involved in the beta-amyloid induced deregulation of  
cdk5 activity in hippocampal neurons. *Exp Cell Res* 2001;264:  
266–275.
33. Otho C, Concha II, Arendt T, et al. A betaPP induces cdk5-dependent  
tau hyperphosphorylation in transgenic mice Tg2576. *J Alzheimers*  
*Dis* 2002;4:417–430.
34. Zambrano CA, Egana JT, Nunez MT, et al. Oxidative stress promotes  
tau dephosphorylation in neuronal cells: the roles of cdk5 and PP1.  
*Free Radic Biol Med* 2004;36:1393–1402.
35. Lavados M, Guillon M, Mujica MC, et al. Mild cognitive impairment  
and Alzheimer's patients display different levels of redox-active CSF  
iron. *J Alzheimers Dis* 2008;13:225–232.

- 565 36. Neumann K, Navarrete L, Rojo L, et al. Insulin resistance and  
566 Alzheimer's disease: molecular links and clinical implications. *Curr*  
567 *Alzheimers Res* 2008;5:438-447. 585
- 568 37. Orellana DI, Quintanilla RA, Maccioni RB. Neuroprotective effect of  
569 TNFalpha against the beta-amyloid neurotoxicity mediated by cdk5  
570 kinase. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:254-263. 586
- 571 38. Schwab C, McGeer PL. Inflammatory aspects of Alzheimer's disease  
572 and other neurodegenerative disorders. *J Alz Dis* 2008;13:359-369. 587
- 573 39. Quintanilla RA, Orellana DI, Gonzalez-Billault C, et al. Interleukin-6  
574 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating  
575 the cdk5/p35 pathway. *Exp Cell Res* 2004;295:245-257. 588
- 576 40. Saez ET, Pehar M, Vargas M, et al. Production of NGF by beta amyloid stim-  
577 ulated astrocytes induces p75NTR-dependent tau hyperphosphorylation  
578 in cultured hippocampal cells. *J Neurosci Res* 2006;84:1098-1106. 589
- 579 41. Saez ET, Pehar M, Barbeito L, et al. Astrocytic nitric oxide triggers  
580 tau hyperphosphorylation in hippocampal neurons. *In vivo* 2004;18:  
581 275-280. 590
- 582 42. Leclerc E, Sturchler E, Vetter SW, et al. Crosstalk between calcium,  
583 amyloid beta and the receptor for advanced glycation endproducts in  
584 Alzheimer's disease. *Rev Neurosci* 2009;20:95-110. 591
43. Jinwal UK, Koren J, Borysov SI, et al. Hsp90 cochaperone, FKBP51,  
increases Tau stability and polymerizes microtubules. *J Neurosci*  
2010;13(30):591-599. 592
44. Luo W, Dou F, Rodina A, et al. Roles of heat-shock protein 90 in  
maintaining and facilitating the neurodegenerative phenotype in  
tauopathies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:9511-9516. 593
45. Noble W, Planel E, Zehr C, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-  
3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo.  
*Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:6990-6995. 594
46. Le Corre S, Klafki HW, Plesnila N, et al. An inhibitor of tau hyper-  
phosphorylation prevents severe motor impairments in tau transgenic  
mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:9673-9678. 595
47. Oz M, Lorke D, Petroianu G. Methylene blue and Alzheimer's  
disease. *Biochem Pharmacol* 2009;78:927-932. 596
48. Pickhardt M, Gazova Z, Bergen M, et al. Anthraquinones inhibit tau  
aggregation and dissolve Alzheimer's paired helical filaments in vitro  
and in cells. *J Biol Chem* 2005;280:3628-3635. 597
49. Rojo LE, Alzate-Morales J, Saavedra IN, et al. Selective interaction of lan-  
soprazole and astemizole with Tau polymers: potential new clinical use in  
diagnosis of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2010;19:573-589. 598

UNCORRECTED PROOF

# La neuroinflamación como factor detonante del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer

## Nuroinflammation as a triggering factor for Alzheimer's disease

Inelia Morales G.<sup>1</sup>, Gonzalo Fariás G.<sup>2</sup> y Ricardo B. Maccioni B.<sup>3</sup>

The progressive increase in life expectancy of the world population has fostered a major concern in order to find effective avenues for diagnosis or treatment of Alzheimer's disease (AD). Even though AD pathogenesis is still unclear, new advances have allowed to understand that exposure of individuals to a series of environmental risk factors, named to as damage signals, play a main role in triggering the disease. This is important for AD prevention but also for the search of new treatment approaches. Activation of innate immunity in the central nervous system (CNS), essentially microglial cells, appears to be a key element in the neurodegenerative pathway. As a matter of fact, when microglia cells are exposed continuously to damage signals such as metabolites from conditions of hyperlipidemia, hyperglycemia, oxidative stress, head injury and trauma, recurrent infections, in addition to supramolecular aggregates such as tau filaments or  $\beta$ -amyloid oligomers, among other anomalous protein filaments, they respond by triggering the inflammatory cascade. On this basis, we have postulated the neuroimmunomodulation hypothesis for Alzheimer's Disease. Therefore, we postulate that a long-term activation of brain innate immunity by a converging set of damage signals constitute a unifying mechanism that triggers the inflammatory cascade, thus leading to irreversible alteration in the neuronal cytoskeleton. These concerted alterations in signaling mechanisms will lead in neuronal cells to a final common pathway, tau hyperphosphorylation, with the consequent self-aggregation of modified tau and formation of paired helical filaments (PHFs), as the main triggering event for neurodegeneration in AD.

**Key words:** Alzheimer's disease, microglia, innate immunity, neuroinflammation, cytokines, tau protein, neurofibrillar tangles

Rev Chil Neuro-Psiquiat 2010; 48 (1): 49-57

**Abreviaciones importantes:** EA (enfermedad de Alzheimer); PHFs (filamentos pareados helicoidales); ONF (ovillos neurofibrilares); SNC (sistema nervioso central), A $\beta$  (péptidos beta amiloide).

Recibido: 01/12/2009

Aceptado: 03/03/2010

Laboratorio de Neurociencias Celulares y Moleculares, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile y Centro Internacional de Biomedicina (ICC):

<sup>1</sup> Tesista Ingeniería en Biotecnología Molecular, Universidad de Chile.

<sup>2</sup> M.D.

<sup>3</sup> Ph.D.

## Introducción

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia en los adultos mayores y se ha asociado, entre otros factores, al aumento en las expectativas de vida y longevidad de las personas en países industrializados, pero también en el mundo en desarrollo. Esta patología se caracteriza por una progresiva pérdida de memoria, deterioro cognitivo y cambios en la personalidad<sup>1</sup>. La prevalencia de la EA es de un 1% en individuos entre 60-64 años, y se ha visto que aumenta exponencialmente con la edad, tanto que en segmentos etáreos que superan los 85 años, la prevalencia de la EA llega a un 50%<sup>2</sup>. Sólo en EE.UU. los casos de EA son alrededor del 70% del total de los casos de demencia en personas que superan los 71 años<sup>3</sup>. Este panorama plantea un gran problema para la salud pública de los países y genera un gran desafío para la ciencia médica. Por otra parte, el aumento en el promedio de la expectativa de vida otorga preponderancia a la esfera de la prevención, considerando la gran preocupación actual por mejorar la calidad de vida de los adultos mayores.

La EA es una enfermedad multifactorial, generalmente de tipo esporádica, pues sólo el 2% de los casos corresponden al denominado Alzheimer de tipo familiar relacionado a mutaciones puntuales específicas<sup>4</sup>. Esta enfermedad neurodegenerativa se caracteriza por la formación de dos tipos de agregados de proteínas en el cerebro: las placas seniles y los ovillos neurofibrilares (NTFs), formados por amiloide (A $\beta$ ) y tau alterada, respectivamente<sup>5</sup>. Evidencias histológicas indican que los NTFs formados por la autoagregación de la proteína tau hiperfosforilada y agregada, en filamentos helicoidales pareados (PHFs), son patognomónicos de la enfermedad, y que la patología de tau se correlaciona directamente con su evolución clínica<sup>4,5</sup>.

Entre los factores de riesgo de la EA encontramos la vulnerabilidad y/o susceptibilidad genética debida a polimorfismos entre determinados grupos de sujetos<sup>6</sup>. Por otro lado, también existen antecedentes de diversos factores que incrementan el riesgo de desarrollar EA como traumatismos craneoencefálicos, una dieta rica en grasas, alteraciones en la

hómeostasis del colesterol, deficiencias de vitamina B12, infecciones recurrentes<sup>7</sup> y sobrecarga de hierro redox en el cerebro<sup>8</sup>, entre otros. Ninguno de los anteriores parece ser un factor etiológico directo<sup>9</sup>, sino que más bien actuarían como señales de daño, que se traducen molecularmente en: estrés oxidativo, cambios en la respuesta inmune, activación de las células gliales (involucrando la producción de citoquinas proinflamatorias y de señalización anómalas), anormalidades proteicas (alteraciones postraduccionales y agregación de la proteína tau y formación de agregados de péptido-amiloide), alteraciones sinápticas y factores neurotóxicos<sup>10</sup>.

Uno de los grandes problemas en la investigación actual sobre la EA reside en la carencia de un paradigma conceptual integrado y coherente que explique su patogénesis. Esta carencia ha dificultado la búsqueda de nuevas drogas para una adecuada terapia farmacológica, considerando que toda nueva droga debe orientarse hacia blancos bien definidos para atacar molecularmente blancos terapéuticos relevantes para la fisiopatología de la EA desde sus estadios iniciales. Así, considerando esta necesidad de un marco teórico confiable y recogiendo abundante evidencia de diversos grupos de investigación a nivel mundial, hemos propuesto como hipótesis central que, una activación de largo plazo en el sistema inmune innato, producto de un conjunto de alteraciones individuales de factores de riesgo, constituye un mecanismo unificado capaz de gatillar una cascada inflamatoria que converge en alteraciones en el citoesqueleto (agregación de tau, formación de PHFs) con consecuencias neurodegenerativas<sup>9</sup>. Esta hipótesis, que hemos denominado de la neuroinmunomodulación<sup>9</sup>, provee una base conceptual científicamente fundamentada, además de un mecanismo unificado que explique la diversidad de los factores de riesgo, su exposición a largo plazo y la respuesta individual a tales daños.

## Diferentes factores de daño desencadenan la neurodegeneración del tipo Alzheimer

La EA se ha transformado en el caso más común de demencia y podría alcanzar proporcio-

nes epidémicas, si es que no se encuentra cura o tratamiento efectivo en la próxima década. Esta enfermedad se proyecta como el mayor problema de salud pública y una de las más costosas de la sociedad moderna por el aumento en la expectativa de vida, sin considerar además, la desgastante sobrecarga económica y la responsabilidad emocional que ésta significa para los parientes de quienes la padecen<sup>11</sup>. Por ello se hace urgente la búsqueda de conocimientos que descifren las bases moleculares y celulares de esta devastadora enfermedad, para desarrollar mecanismos de prevención y tratamientos efectivos para combatir su patología.

Aunque, en mucho de los casos, las causas que detonan la EA son más bien desconocidas, los expertos coinciden en que en la EA, así como en otras condiciones crónicas, se desarrolla como un resultado de múltiples factores que convergen en la misma causa, pero también declaran que el mayor factor de riesgo para la enfermedad es el aumento de la edad<sup>3</sup> y esto se evidencia en que la enfermedad la padecen principalmente individuos mayores de 65 años.

Por otro lado, 2 a 5% de los casos de EA<sup>3,4</sup> son causados por una rara variación genética, mutaciones descritas en un pequeño número de familias alrededor del mundo. Estos individuos pueden desarrollar la enfermedad antes de los 65 años o incluso en algunos casos, antes de los 30 años<sup>3</sup>. Un ejemplo de la relación entre factores genéticos de susceptibilidad y la EA es la presencia del alelo *apolipoproteína 4* (Apo4). Esta es una de las formas alélicas del gen ApoE que aumenta el riesgo de desarrollar EA. Si bien, este polimorfismo aumenta el riesgo de desarrollar la enfermedad, ésta no se manifiesta necesariamente<sup>3,12,13</sup>, a diferencia de las mutaciones en los genes de PSI, PS2 o la proteína APP donde si hay correlación con la aparición temprana de la enfermedad.

Se cuenta con abundante evidencia de la relación entre factores metabólicos y el riesgo de desarrollar EA. El rol del metabolismo lipídico queda de manifiesto al considerar que la *apolipoproteína E* (incluido el genotipo 4/4) cumple importantes funciones en la movilización del colesterol en el torrente sanguíneo, al igual que ocurre con otras lipoproteínas. Se ha relacionado el desarrollo de algunos desordenes

neurodegenerativos con la alteración en la actividad de lipoproteínas neuronales así como también en la homeostasis del colesterol y otros lípidos de importancia en la actividad neuronal<sup>14</sup>.

El cerebro es el órgano humano más rico en colesterol, y éste es cerca del 20-25% del total de los lípidos en la membrana plasmática de las neuronas<sup>6</sup>. El colesterol cerebral es principalmente sintetizado localmente en el SNC. Se estima que durante el desarrollo del SNC las neuronas sintetizan más colesterol del que necesitan para su crecimiento y sus procesos sinaptogénicos, pero una vez que maduran las neuronas se reduce la síntesis endógena y la neurona comienza a depender del colesterol sintetizado y secretado por los astrocitos<sup>15</sup>.

El colesterol influye en la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo de la proteína precursora del amiloide (APP) y en la producción de péptidos-amiloide<sup>16</sup>. El alto contenido de colesterol en las balsas lipídicas de las membranas celulares, facilita la ruptura de la proteína precursora del amiloide, induciendo la producción de A que se ha relacionado al desarrollo de EA<sup>16</sup>.

Por su parte, el metabolismo glucídico tiene una clara relación con el funcionamiento encefálico, tanto en condiciones normales como en diversas patologías. El cerebro humano utiliza la glucosa como fuente de energía y, por ende, la homeostasis de este sustrato es clave para la mantención celular, la neurogénesis, la regulación de neurotransmisores, la supervivencia celular y la plasticidad sináptica, entre otros procesos claves en el desarrollo cognitivo de la persona. Por lo que, en un cuadro diabético, niveles tóxicos de insulina influirán negativamente en la función y la sobrevivencia neuronal<sup>17</sup>. La presencia de cuadros de hiperinsulinemia se correlaciona con la remoción anormal de A conduciendo a alteraciones en la proteína tau, traducidos en la hiperfosforilación de ésta por efecto del aumento en la actividad de las proteínas quinasas cdk5 y GSK3-. Estas alteraciones celulares convergerían en cascadas de degeneración neuronal involucradas en el desarrollo de EA<sup>17</sup>.

Estudios recientes demuestran que el estrés oxidativo también constituye un motivo en el desarrollo de la EA. La capacidad redox de metales tales

como hierro, cobre y zinc sirve como mediador en el desarrollo de condiciones neurodegenerativas<sup>8</sup>. El estrés oxidativo, que se define por la generación de una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS), es altamente dañino ya que conduce a la alteración en la estructura de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, conduciendo a la muerte celular<sup>8</sup>. Altos niveles de cobre y de hierro<sup>18</sup> han sido detectados en el plasma sanguíneo de personas con EA. Estos metales catalizan la producción de ROS por la reacción de Fenton originando radicales hidroxilos altamente reactivos<sup>8,18,19</sup>, por lo que la reactividad de estos metales puede estar relacionada a daño celular y neurodegeneración.

Por último, deseamos destacar el rol que pueden jugar factores externos, tales como una historia de traumatismos encefálicos, pues se ha demostrado que estos también aumentan el riesgo de desarrollar demencias de tipo neurodegenerativas, como se ha observado en el caso de la "demencia pugilística", en donde se han descrito casos de formación difusa de placas seniles y la presencia de NTFs<sup>12,20</sup>.

### Los efectos extracelulares de tau

Por otra parte, la proteína tau es una proteína citosólica que cumple un papel fundamental en el mantenimiento de los microtúbulos de la célula neuronal y como componente del transporte axonal, por lo que cualquier alteración que sufra esta proteína se traduce en serias repercusiones en la estabilidad del citoesqueleto<sup>19,21</sup>. Actualmente se sabe que, en la EA, la proteína tau es modificada producto de hiperfosforilación que conduce a su auto-agregación, desencadenando la desarticulación de los microtúbulos, lo que se traduce en trastornos en la actividad neuronal, provocando una pérdida en su capacidad de transmitir mensajes nerviosos y ocasionando finalmente el proceso neurodegenerativo<sup>22</sup>.

Si bien se han planteado diversas hipótesis para explicar la patogénesis de la EA y, aún hoy, este tema persiste en el foco central del debate científico, se ha llegado a concluir que las diferentes alteraciones en los mecanismos de señalización neuronales convergen en una ruta central común:

la hiperfosforilación de tau, como agente gatillante de la degeneración neuronal<sup>6</sup>.

Si bien los agregados de tau, que originan estructuras mayores como PHEs y posteriormente NFTs, son el agente clave en la neurodegeneración desencadenada desde el interior celular, es válido cuestionarse que efecto tendría tau en forma monomérica o en sus distintos estadios de modificación y agregación, una vez ocurrida la muerte celular, al entrar en contacto con otras células en el espacio extracelular.

Estudios en cultivos celulares en líneas de neuroblastoma expuestos a proteína tau han evidenciado que ésta se vuelve nociva para las células, sugiriendo que la acumulación de tau extracelular encontradas en patologías como la EA podría ser un agente de propagación de la muerte celular<sup>21,23</sup>. Eventualmente, el estado de agregación de la proteína en el medio extracelular sería una variable más con efecto dañino sobre las células y su toxicidad, parecería ser dependiente de los receptores muscarínicos involucrados en el aumento del calcio intracelular<sup>21</sup>. Por lo que sus efectos, a nivel de la alteración en la homeostasis del calcio intracelular, conllevarían a la hiperfosforilación de tau, lo cual estaría directamente relacionado con el explosivo deterioro celular en la EA<sup>23</sup>.

Actualmente en nuestro laboratorio se encuentran en curso estudios de la respuesta de cultivos celulares microgliales frente a la exposición de distintas variantes de tau y oligómeros de ésta. Resultados preliminares a partir de estudios morfológicos y ensayos bioquímicos muestran que las células microgliales serían activadas por agregados de proteína tau, lo que explicaría los efectos de variantes modificadas de tau que son liberados al extacelular como resultado de la muerte de ciertas poblaciones neuronales.

### Activación microglial e hipótesis de la Neuroinmunomodulación

Las células microgliales descritas por primera vez en 1932 por Del Río Hortega representan entre el 5-15% del total de la población celular cerebral, distribuyéndose mayoritariamente en el hipocam-

po y en la sustancia nigra<sup>24-27</sup>. Este tipo celular es considerado el macrófago del cerebro, capaz de realizar fagocitosis y presentación de antígenos, lo que lo convierte en la célula representante del sistema inmune en el SNC<sup>24-26</sup>. Bajo condiciones fisiológicas estas células presentan una morfología ramificada con una mínima expresión de moléculas asociadas con su función macrofágica<sup>26,27</sup>, estado celular que se ha denominado como inactivado.

Estas células pueden permanecer en su estado inactivado por largos periodos de tiempo, pero pueden, repentinamente, modificar su comportamiento ya que son, altamente sensibles a los cambios del entorno, por lo que cuando reciben un estímulo fisiológico o patológico son capaces de migrar a la zona de la lesión e inducir su activación, la que esta asociada con el incremento en su proliferación<sup>26</sup>.

Una enorme variedad de señales tales como estructuras bacterianas, virales y fúngicas, proteínas endógenas anormales, factores del complemento, anticuerpos, citoquinas y quimioquinas, entre otros, son "sensados" por los receptores de las células microgliales lo que conduce a su activación<sup>24-26</sup>.

La activación microglial, además de aumentar la proliferación, induce cambios drásticos en su morfología celular la cual pasa de un estado altamente ramificado a un fenotipo ameboideo. Con la activación, también se induce la expresión de marcadores de superficie como el MHC II, la secreción de sustancias citotóxicas (radicales libres de oxígeno, óxido nítrico, etc) y la liberación de una variedad de citoquinas y factores de crecimiento<sup>24,28</sup>. Todas estas moléculas permiten la comunicación regulada de la célula activada con otras células microgliales inactivadas, con células cerebrales y del sistema inmunológico.

Actualmente hay evidencias de que existe una serie de señales de daño innatas que estarían involucradas en la detonación de la activación microglial y, dado su carácter constante, conllevarían a la activación permanente de las células provocando en ellas una sobre activación<sup>9</sup>.

Cuando se gatilla la sobre activación microglial, la constante liberación de factores citotóxicos y citoquinas pro-inflamatorias origina un fenómeno

neuroinflamatorio el cual se ha evidenciado estar directamente relacionado con la degeneración neuronal, principalmente por efecto de las moléculas pro-inflamatorias<sup>9,28-30</sup>, lo cual implica a las microglías y las citoquinas como agentes claves en el desarrollo de desordenes neurodegenerativos como la EA<sup>31</sup>.

Estudios clínicos en pacientes que han recibido sistemáticamente drogas antiinflamatorias no esteroideas (NSAIDs) muestran que estos presentan una disminución en la incidencia de EA, sugiriendo que el aminorar la inflamación cerebral ayudaría a prevenir o mantener baja la posibilidad de desarrollar EA<sup>9,10,32</sup>. Este último punto pone de manifiesto la importancia del papel que juegan las citoquinas proinflamatorias liberadas dada la activación glial<sup>29</sup>, por efecto de las señales de daño, como un agente principal en la patogénesis de la EA.

Por otra parte, como ya hemos descrito, factores tan diversos como traumatismos y golpes en la cabeza, alteraciones en la regulación del colesterol, cuadros diabéticos, constantes infecciones, un alto consumo de grasas, deficiencia de vitamina B12, etc., incrementan el riesgo de padecer la EA<sup>9</sup>, pero ¿cómo se podría relacionar esto con la neuroinflamación?

Todos estos factores que se arrastran por un tiempo prolongado en las personas se transforman, a largo plazo, en señales de daño que pueden ser "sensadas" por las células microgliales, es decir son traducidas en el organismo en una mayor producción de especies reactivas de oxígeno, ox-LDL, AGEs, proteínas anormales y formación de agregados proteicos, entre otros. Todas estas señales internas activan la célula microglial mediante los receptores para productos finales de glicación avanzada (RAGEs) o bien por los receptores del tipo *Toll like receptors* (TLRs). Por otro lado traumatismos inducen la producción de oligómeros de A $\beta$ , productos finales de glicación avanzada (AGEs) y proteína S-100 lo que se suma al estímulo detonante de la activación microglial<sup>9,29</sup>.

Finalmente, la activación microglial se traduce en la detección de las señales de daño que inducen un aumento en la actividad del factor de transcripción NF- $\kappa$ B el que a su vez estimula la producción de sustancias citotóxicas y citoquinas pro-inflamatorias, tales como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, entre otras, que des-



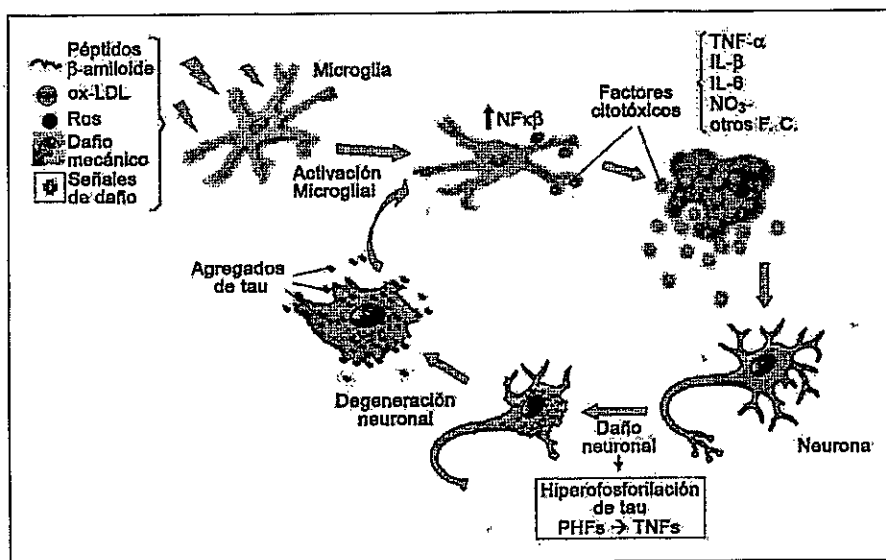


Figura 1. Modelo de activación microglial conducente a la neurodegeneración del tipo de la enfermedad de Alzheimer. Células microgliales sensibles a diferentes señales de daño son sobreactivadas en el largo plazo, produciendo la liberación de compuestos citotóxicos hacia las neuronas (principalmente citoquinas proinflamatorias) que conducen al daño neuronal. Producida la degeneración neuronal, agregados de tau liberados al medio extracelular, contribuyen al ciclo de sobreactivación microglial.

encadenan la degeneración neuronal por diferentes vías, pero todas convergentes en la alteración de la proteína tau<sup>5,6,9,29</sup>. Una representación esquemática que ilustra la acción de las denominadas "señales de daño" en vía hacia la neurodegeneración se muestra en la Figura 1.

Con estos antecedentes, hemos propuesto la hipótesis de la Neuroinmunomodulación<sup>9</sup>, que explica el fenómeno de la activación de largo plazo del sistema inmune innato por un conjunto de factores de riesgo, constituyendo un mecanismo unificado que determina la detonación de la cascada inflamatoria que converge en alteraciones en el citoesqueleto (auto-agregación de tau y formación de PHFs) que confluye en la EA como un final común. Por otro lado, ocurrida la neurodegeneración, son liberados al medio extracelular los agregados de proteína tau alterada, los cuales estarían asociados a la mantención del estado activado de la célula microglial, además de ser agregados proteicos de carácter neurotóxico<sup>21,23</sup>.

## Conclusiones

La EA se puede explicar como un desorden neurodegenerativo asociado a numerosas formas de daño que determinan en último término la activación de mecanismos de neuroinmunoinflamación que a su vez se encuentran directamente relacionados con la activación microglial y elevados niveles de citoquinas proinflamatorias<sup>12,33</sup>. Sin embargo, la activación microglial es un proceso diverso fenotípica y funcionalmente, ya que se encuentra determinado por los tipos de estímulos, de la intensidad de éstos y el contexto en que estos se dan y no necesariamente será nocivo, pues, en una primera instancia, puede tener características neuroprotectoras<sup>26</sup>. En suma, es el balance entre el efecto neurotóxico contra el neuroprotector, así como la relación y balance entre los factores microgliales anti- y pro-inflamatorios, lo que determina el papel de la microglia que juega en el desarrollo de una patología o en una condición de daño leve<sup>28</sup>.

## Resumen

El constante aumento en la expectativa de vida en la población mundial ha incrementado la preocupación hacia la búsqueda de la comprensión de la Enfermedad de Alzheimer (EA), así como de su diagnóstico temprano y tratamiento. Actualmente la etiopatogenia que conduce al desarrollo de la EA es aún difusa, pero se ha llegado a comprender que la exposición a una serie de distintos factores de riesgo, o señales de daño, está asociada al desencadenamiento de la EA. Esto es muy importante no solo para la prevención de esta devastadora enfermedad sino también para la búsqueda de avenidas efectivas para su tratamiento. En efecto, la activación de la inmunidad innata en el sistema nervioso central (SNC), esencialmente por las células microgliales, son un elemento clave en el proceso neurodegenerativo, cuando éstas son expuestas por períodos prolongados a señales de daño. Entre éstas están la hiperlipidemia, hiperglicemia, estrés oxidativo, traumatismos, infecciones recurrentes, oligómeros de  $\beta$ -amiloide, agregados de tau, entre otros factores, los que desencadenarían una respuesta pro-inflamatoria persistente que conduce a la cascada neurodegenerativa. En base a esto, hemos postulado la teoría de la neuroinmunomodulación en la EA, y proponemos que la activación a largo plazo del sistema inmune innato por un conjunto de señales de daño constituye un mecanismo unificado que gatilla una cascada inflamatoria que conduce a alteraciones irreversibles en el citoesqueleto. Estos mecanismos anómalos de señalización molecular llevarían a una vía final común que es la hiperfosforilación de la proteína tau, su autoagregación y formación de los PHFs, como desencadenantes claves en la neurodegeneración y desarrollo de la EA.

**Palabras clave:** Enfermedad de Alzheimer, microglia, inmunidad innata, neuroinflamación, citoquinas, proteína tau, ovillos neurofibrilares.

## Referencias

- Weiner H L, Frenkel D. Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Nature Reviews* 2006; 6: 404-16.
- Blennow K, de Leon M J, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *The Lancet* 2006; 368: 387-403.
- Alzheimer's Association. 2009 Alzheimer's diseases Facts and Figures. *Alzheimer's & Dementia* 2009; 5: 234-70.
- Maccioni R B, Fariás G A, Rojo L E, Sekler M A, Kuljis R O. What have we learned from the tau hypothesis? *Current Hypotheses and Research Milestones in Alzheimer's Disease* Springer 2009; 49-62.
- Maccioni R B, Muñoz J P, Barbeito L. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Archives of Medical Research* 2001; 32: 367-81.
- Maccioni R B, Rojo L E, Fernández J A, Kuljis R O. The role of neuroimmunomodulation in Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* 2009; 1153: 240-6.
- Rojo L E, Sjöberg M K, Hernández P, Zambrano C, Maccioni R B. Roles of cholesterol and lipids in the etiopathogenesis of Alzheimer's disease. *J Biomed Biotechnol* 2006; 1-17.
- Lavados M, Guillón M, Mujica M C, Rojo L E, Fuentes P, Maccioni R B. Mild cognitive impairment and Alzheimer patients display different levels of redox-active CSF iron. *J Alzheimers Dis* 2008; 2: 225-32.

9. Fernández J A, Rojo L E, Kuljis R O, Maccioni R B. The damage signals hipótesis of Alzheimer's disease pathogenesis. *J Alzheimers Dis* 2008; 14: 329-33.
10. Maccioni R B. Nuevas Avenidas hacia el diagnóstico y tratamiento de los desordenes cognitivos: enfermedad de Alzheimer. *Medwave*. 2008; Año VIII, Nº 11.
11. Maccioni R B, Lavados M, Maccioni C B, Mendoza-Naranjo A. Biological markers of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Curr Alzheimer Res* 2004; 1 (4): 307-14.
12. Griffin W S, Sheng J G, Royston M C, Gentleman S M, McKenzie J E, Graham D I, *et al*. Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression. *Brain Pathol* 1998; 8 (1): 65-72.
13. Strittmatter W J, Roses A D. Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92 (11): 4725-7.
14. Sekler A, Jiménez J M, Rojo L, Pastene E, Fuentes P, Slachevsky A, *et al*. Cognitive impairment and Alzheimer's disease: Links with oxidative stress and cholesterol metabolism. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2008; 4 (4): 715-22.
15. Dietschy J M, Turley S D. Thematic review series: brain lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res* 2004; 45 (8): 1375-97.
16. Kuo Y M, Emmerling M R, Bisgaier C L, Essenburg A D, Lampert H C, Drumm D, *et al*. Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain abeta 1-42 levels. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 252 (3): 711-5.
17. Neumann K F, Rojo L E, Navarrete L P, Farias G, Reyes P, Maccioni R B. Insulin resistance and Alzheimer's disease: molecular links & clinical implications". *Curr Alzheimer Res* 2008; 5: 438-47.
18. Ozcankaya R, Delibas N. Malondialdehyde, superoxide dismutase, melatonin, iron, copper, and zinc blood concentrations in patients with Alzheimer disease: cross-sectional study. *Croat Med J* 2002; 43 (1): 28-32.
19. Perry G, Sayre L M, Atwood C S, Castellani R J, Cash A D, Rotkamp C A, *et al*. The role of iron and copper in the aetiology of neurodegenerative disorders: therapeutic implications. *CNS Drugs* 2002; 16 (5): 339-52.
20. Mortimer J A, van Duijn C M, Chandra V, Fratiglioni L, Graves A B, Heyman A, *et al*. Head trauma as a risk factor for Alzheimer's disease: a collaborative re-analysis of case-control studies. EURODEM Risk Factors Research Group. *Int J Epidemiol* 1991; 2: 28-35.
21. Ávila J. The tau code. *Front Ag Neurosci* 2009; 1: 1.
22. Maccioni C, Arzola M E, Mujica L, Maccioni R B. Nuevos paradigmas en el estudio de la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Chil Neuro-Psiquiat* 2003; 4 (Supl 2): 33-46.
23. Gómez-Ramos A, Díaz-Fernández M, Cuadros R, Hernández F, Ávila J. Extracellular tau is toxic to neuronal cells. *FEBS Letters* 2006; 580: 4842-50.
24. Veneti S, Wiley C A, Kofler J. Imaging microglial activation during neuroinflammation and Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol Pharmacol* 2009; 4 (2): 227-43.
25. Kreutzberg G W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 1996; 19 (8): 312-8.
26. Hanisch U K, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 2007; 10 (11): 1387-94.
27. Ramírez-Expósito M J, Martínez-Martos J M. Modificaciones morfológicas y funcionales de la microglia en respuesta a procesos neurodegenerativos en el sistema nervioso central. *Arch Neurocién (Mex)* 1999; 4 (1): 21-34.
28. Li L, Lu J, Tay S S, Moochhala S M, He B P. The function of microglia, either neuroprotection or neurotoxicity, is determined by the equilibrium among factors released from activated microglia in vitro. *Brain Res* 2007; 1159: 8-17.
29. Rojo L E, Fernández J A, Maccioni R B, Jiménez J M, Maccioni R B. Neuroinflammation: Implications for the pathogenesis and molecular diagnosis of Alzheimer's disease. *Archives of Medical Research* 2008; 39: 1-16.
30. Hirsch E C, Hunot S. Neuroinflammation in

- Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol* 2009; 8 (4): 382-97.
31. Mrazek R E. Neuropathology and the neuroinflammation idea. *J Alzheimer's Dis* 2009; 18: 473-81.
  32. McGeer PL, Rogers J, McGeer E G. Inflammation, anti-inflammatory agents and Alzheimer disease: the last 12 years. *J Alzheimers Dis* 2006; 9: 271-6.
  33. Desai B S, Schneider J A, Li J L, Carvey P M, Hendey B. Evidence of angiogenic vessels in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2009; 116 (5): 587-97.

---

Correspondencia:

Dr. Ricardo B. Maccioni  
Laboratorio de Biología Celular,  
Molecular y Neurociencias,  
Facultad de Ciencias, Universidad de Chile  
International Center for Biomedicine (ICC)  
Edificio Milenio, Las Encinas #3370,  
Ñuñoa, Santiago  
Sitio web: [www.ricardomaccioni.com](http://www.ricardomaccioni.com)  
Teléfonos: 562-978 7228 / 562-953 6362  
E-mail: [rmaccion@manquehue.net](mailto:rmaccion@manquehue.net)