



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Evaluación del potencial terapéutico de agonistas sintéticos y naturales de LXR (GW3965 y *Nectandra reticulata*) en el modelo murino 3xTg-AD de la enfermedad de Alzheimer**

Jennifer Alejandra Caicedo Díaz

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, D.C, Colombia  
2021

# **Evaluación del potencial terapéutico de agonistas sintéticos y naturales de LXR (GW3965 y *Nectandra reticulata*) en el modelo murino 3xTg-AD de la enfermedad de Alzheimer**

Jennifer Alejandra Caicedo Díaz

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias - Bioquímica**

Director (a):

Adrián Gabriel Sandoval Hernández PhD

Línea de Investigación:

Enfermedades Neurodegenerativas

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Muerte Celular  
Instituto de Genética

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Química  
Bogotá, Colombia  
2021

# Dedicatoria

A mis padres, quienes me han apoyado incondicionalmente en mi desarrollo profesional y quienes con su inmenso amor han confiado en mi.

A mi hermano Andrés, quien ha sido mi modelo a seguir y quien ha sido la guía profesional y emocional en este camino.

A Daniel Santos, quien con su amor y comprensión me acompañó en este largo camino, y me dio fuerzas para continuar.

# Declaración de obra original

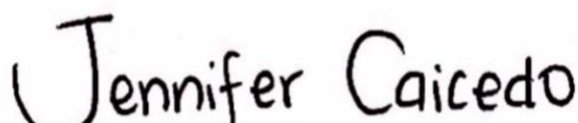
Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



---

**Nombre:** Jennifer Alejandra Caicedo Díaz

**Fecha:** 26 de Noviembre de 2021

# Agradecimientos

Los autores agradecemos al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, por la financiación de esta investigación mediante el proyecto: *“Evaluación de los mecanismos moleculares asociados a la activación farmacológica de LXR en modelos de la enfermedad de Alzheimer y del potencial terapéutico de un extracto de Nectandra reticulata (Lauraceae)”*, convocatoria 727-2018.

Al Ministerio de Medio Ambiente por el otorgamiento del Otrosí N° 21 al Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados N° 121 del 22 de Enero de 2016 suscrito entre el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Universidad Nacional de Colombia, por medio del cual se ampara el uso para investigación del material vegetal que hace parte de esta investigación.

Al Doctor Adrián Gabriel Sandoval por la dirección, apoyo y confianza en el desarrollo de este trabajo y en mi camino profesional.

A la Doctora Jenny Ortega quien me guio en el proceso de extracción de RNA, quien lidero y desarrollo el proceso de análisis de secuenciación de RNA de las muestras.

Al Doctor Gonzalo Arboleda Bustos por su acompañamiento en el proceso de formación.

Al Instituto de Genética y a sus trabajadores, por permitirme hacer de este lugar mi segundo hogar.

A la facultad de Ciencias y el departamento de Química por permitirme cumplir mi sueño de realizar mi maestría.

A los docentes de la maestría en Bioquímica, quienes fueron parte crucial de mi desarrollo profesional en la maestría.

A mis compañeros del grupo de investigación, en especial a Juan Carlos Ruiz quien se convirtió en amigo en este proceso y a Gina Guio quien fue un apoyo incondicional.

A mi familia por la paciencia, acompañamiento y amor incondicional en este proceso, en especial a mis padres Ricardo Caicedo y Martha Díaz, a mi hermano Andrés Caicedo por ser mi modelo a seguir.

A Daniel Felipe Santos, por su amor y comprensión en este camino.

# Resumen

## Evaluación del potencial terapéutico de agonistas sintéticos y naturales de LXR (GW3965 y *Nectandra reticulata*) en el modelo murino 3xTg-AD de la enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por deterioro cognitivo y la presencia de placas amiloides y ovillos neurofibrilares. Los agonistas sintéticos del receptor nuclear X hepático (LXR) han producido mejoría cognitiva asociada al incremento de ApoE y ABCA1 en modelos murinos de la EA. Por otro lado, la diversidad molecular de los productos naturales vegetales representa un recurso multidiana promisorio para el tratamiento de la EA, en estudios previos dentro del grupo, observamos que el extracto de *Nectandra reticulata* presenta actividad agonista de LXR, actividad antioxidante y protectora frente a neurotóxicas, por lo cual se planteó el objetivo de evaluar el potencial terapéutico de un extracto etanólico de *Nectandra reticulata* y el agonista sintético GW3965 en el modelo murino triple transgénico de la EA (3xTg-AD). **Métodos:** Se administró independientemente el extracto etanólico de *Nectandra reticulata* (25 mg/kg/día) y el agonista de LXR GW3965 (33 mg/kg/día) durante 12 semanas en animales triple transgénicos de la enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD). Se evaluaron cambios cognitivos mediante el laberinto acuático de Morris, histopatológicos, bioquímicos y de expresión génica. **Resultados:** Se observó que el extracto de *N. reticulata* en animales 3xTg-AD en comparación con los animales 3xTg-AD tratados con el vehículo incremento de la expresión de ApoE ( $P < 0,05$ ), reduce la astrogliosis en el hipocampo ( $P < 0.001$ ) y reduce la fosforilación de Tau en el hipocampo ( $P > 0.0001$ ), asociado a la reducción de p25 ( $P < 0.01$ ) y de la fosforilación de GSK3 $\beta$  (p-Y216) ( $P < 0.001$ ), sin observar mejoría cognitiva y reducción de la carga amiloide en animales 3xTg-AD. Se observó que el extracto produce cambios expresión diferencial de 3 genes asociados a la unión de lípidos, angiogénesis y unión a ácidos grasos. Respecto al tratamiento en los animales tratados con el agonista sintético GW3965 se observó mejoría cognitiva, sin cambios detectables en la expresión de ApoE, incremento de la expresión de Tau total en el hipocampo ( $p < 0.05$ ) y reducción de p-GSK3 $\beta$  ( $p < 0.05$ ). El análisis de expresión determinó 162 genes expresados diferencialmente, de los cuales se destacan las vías ontológicas asociadas con el incremento de la expresión de genes asociados a componentes integrales de membrana, unión a proteínas y dineínas. **Conclusión:** Se reporta por primera vez que el extracto de *N. reticulata* es capaz de incrementar significativamente la expresión de ApoE, reducir significativamente la

astrogliosis, y la fosforilación de Tau asociado a la regulación negativa de las GSK3 $\beta$  y CDK5. Por su parte, el agonista GW3965 al igual que en trabajos previos mejoró la memoria y el aprendizaje en animales 3xTg-AD, aumento la expresión de GSK3 $\beta$ . De manera novedosa se reporta que GW3965 produjo expresión diferencial de genes relacionados con sinapsis, dendritas, memoria a largo termino y aprendizaje. Estos resultados evidencian el potencial terapéutico de los agonistas sintéticos y naturales de LXR en la EA.

**Palabras clave:** LXR, *Nectandra reticulata*, GW3965, taupatía, 3xTg-AD.



# Abstract

## Evaluation of the therapeutic potential of synthetic and natural LXR agonists (GW3965 and *Nectandra reticulata*) in the 3xTg-AD murine model of Alzheimer's disease

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by cognitive impairment and the presence of amyloid plaques and neurofibrillary tangles. Synthetic hepatic nuclear X receptor (LXR) agonists have produced cognitive enhancement associated with increased ApoE and ABCA1 in murine models of AD. On the other hand, the molecular diversity of plant natural products represents a promising multitarget resource for the treatment of AD, in previous studies within the group, we observed that the *Nectandra reticulata* extract has LXR agonist activity, antioxidant and protective activity against neurotoxic, for which the objective was to evaluate the therapeutic potential of an ethanolic extract of *Nectandra reticulata* and the synthetic agonist GW3965 in the triple transgenic murine model of AD (3xTg-AD). Methods: *Nectandra reticulata* ethanolic extract (25 mg/kg/day) and LXR agonist GW3965 (33 mg/kg/day) were independently administered for 12 weeks in triple transgenic Alzheimer's disease (3xTg-AD) animals. Cognitive changes were evaluated using the Morris water maze, histopathological, biochemical and gene expression. Results: It was observed that the *N. reticulata* extract in 3xTg-AD animals compared to 3xTg-AD animals treated with the vehicle increased ApoE expression ( $P < 0.05$ ), reduced astrogliosis in the hippocampus ( $P < 0.001$ ) and reduces Tau phosphorylation in the hippocampus ( $P > 0.0001$ ), associated with the reduction of p25 ( $P < 0.01$ ) and GSK3 $\beta$  (p-Y216) phosphorylation ( $P < 0.001$ ), without observing cognitive improvement and amyloid load reduction in 3xTg-AD animals. It was observed that the extract produces changes in the differential expression of 3 genes associated with lipid binding, angiogenesis and fatty acid binding. Regarding the treatment in the animals treated with the synthetic agonist GW3965, cognitive improvement was observed, without detectable changes in the expression of ApoE, increase in the expression of total Tau in the hippocampus ( $p < 0.05$ ) and reduction of p-GSK3 $\beta$  ( $p < 0.05$ ). Expression analysis determined 162 differentially expressed genes, of which the ontological pathways associated with increased expression of genes associated with integral membrane components, protein binding, and dyneins stand out. Conclusion: It is reported for the first time that *N. reticulata* extract is able to significantly increase ApoE expression, significantly reduce astrogliosis, and Tau phosphorylation associated with the negative regulation of GSK3 $\beta$  and CDK5. For its part,

the agonist GW3965, as in previous works, improved memory and learning in 3xTg-AD animals, increasing the expression of GSK3 $\beta$ . In a novel way, it is reported that GW3965 produced differential expression of genes related to synapses, dendrites, long-term memory and learning. These results evidence the therapeutic potential of synthetic and natural LXR agonists in AD.

**Key words:** LXR, *Nectandra reticulata*, GW3965, taopathy, 3xTg-AD.

# Contenido

<b>Resumen</b> .....	<b>VII</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>IX</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>XIV</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XVI</b>
<b>Lista de Símbolos y abreviaturas</b> .....	<b>XVII</b>
<b>Capítulo 1. Planteamiento del problema</b> .....	<b>16</b>
<b>Capítulo 2. Estado del Arte</b> .....	<b>18</b>
2.1 Enfermedad de Alzheimer.....	18
2.2 Aspectos moleculares y genéticos de la Enfermedad de Alzheimer .....	19
2.2.1 Proteína precursora amiloide (APP) .....	21
2.2.2 Presenilina 1 (PS1) y Presenilina 2 (PS2) .....	22
2.2.3 Apolipoproteína E (ApoE) .....	22
2.2.4 Tau.....	23
2.2.5 Filamentos helicoidales emparejados y ovillos neurofibrilares .....	24
2.2.6 Fosforilaciones de Tau .....	25
2.2.7 Quinasas de Tau y su relación con la Enfermedad de Alzheimer .....	26
2.3 Hipótesis moleculares .....	28
2.3.1 Hipótesis amiloide .....	28
2.3.2 Hipótesis colinérgica .....	29
2.3.3 Hipótesis hiperfosforilación de Tau.....	30
2.3.4 Hipótesis inflamatoria .....	30
2.4 Receptores Nucleares (RN) y EA .....	31
2.4.1 Receptores X hepático (LXRs).....	32
2.4.3 Ligandos de LXR.....	33
2.4.4 Efecto de la activación de LXR en la EA .....	33
2.5 Alternativas terapéuticas .....	35
2.6 Productos Naturales vegetales y la EA.....	36
2.7 Modelo Animal Triple transgénico de la Enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD) .....	37
<b>Capítulo 3. Justificación</b> .....	<b>39</b>
<b>Capítulo 4. Objetivos</b> .....	<b>41</b>
4.1 Objetivo general .....	41
4.2 Objetivos específicos .....	41
<b>Capítulo 5. Metodología</b> .....	<b>42</b>
5.1 Modelo animal .....	42
5.2 Laberinto acuático de Morris (MWM).....	42
5.3 Inmunofluorescencias.....	43
5.4 Análisis de microscopía confocal .....	44

5.5	Western Blot .....	45
5.6	Extracción de RNA de hipocampos .....	46
5.7	Geles de agarosa para evaluación del RNA.....	47
5.8	RNA Seq.....	47
<b>Capitulo 6. Resultados: Tratamiento con el extracto de <i>Nectandra reticulata</i> .....</b>		<b>49</b>
6.1	El tratamiento con <i>N. reticulata</i> modificó levemente las estrategias de aprendizaje	49
6.2	El tratamiento con <i>N. reticulata</i> no modificó la carga amiloide cerebral en los animales envejecidos .....	51
6.3	El extracto de <i>N. reticulata</i> modifica los niveles de fosforilación en los animales 3xTg- AD.....	55
6.4	El extracto de <i>Nectandra reticulata</i> aumenta los niveles de ApoE en el hipocampo. ....	59
6.5	El extracto de <i>N. reticulata</i> reduce la astrogliosis en el hipocampo del animal 3xTg-AD. ....	63
6.6	El extracto de <i>N. reticulata</i> no induce cambios evidenciables en Iba1 y vasos sanguíneos ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ). ....	66
6.7	El tratamiento <i>N. reticulata</i> disminuye la fosforilación de Tau pero no aumenta su expresión. ....	71
6.8	El tratamiento con <i>N. reticulata</i> disminuye significativamente el clivaje de p35 a p25 en los animales 3xTg-AD. ....	73
6.9	El tratamiento con <i>N. reticulata</i> reduce significativamente la fosforilación Y216 en GSK3 $\beta$ en animales envejecidos. ....	75
<b>Capitulo 7. Resultados: Tratamiento con el agonista sintético GW3965 .....</b>		<b>77</b>
7.1	El tratamiento con GW3965 mejoró significativamente el deterioro cognitivo .....	77
7.2	El tratamiento con GW3965 no produjo cambios significativos en la expresión de ApoE .....	79
7.3	Cambios asociados a la taupatía mediados por el tratamiento con GW3965 en el modelo 3xTg-AD.....	80
7.4	El tratamiento con el agonista sintético GW3965 no modifica la expresión de CDK5 .....	82
7.5	El tratamiento con GW3965 reduce significativamente la fosforilación Y216 de GSK3 $\beta$ en animales envejecidos .....	83
<b>Capitulo 8. Resultados adicionales: Análisis de expresión diferencial .....</b>		<b>86</b>
8.1	Análisis de expresión diferencial entre los animales tratados con <i>N. reticulata</i> y los animales control. ....	86
8.2	Análisis de expresión diferencial entre los animales tratados con GW3965 y los animales control. ....	90
<b>Capitulo 9. Análisis de resultados.....</b>		<b>96</b>
<b>Capitulo 10. Conclusiones .....</b>		<b>107</b>

<b>Capitulo 11. Recomendaciones .....</b>	<b>110</b>
<b>Capitulo 12. Fuentes de financiamiento .....</b>	<b>111</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>112</b>

# Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 2-1.</b> Cambios morfológicos característicos de la EA en neuronas sanas y enfermas relacionados a la severidad de la enfermedad.....	18
<b>Figura 2-2</b> Marcadores histopatológicos de la EA. Placas amiloides y ovillos neurofibrilares.....	20
<b>Figura 2-3</b> Sitios de fosforilación en los dominios de la proteína Tau en condiciones fisiológicas, de la EA y anticuerpos específicos de los epítopes.....	26
<b>Figura 2-4</b> Vías canónicas del procesamiento de la proteína precursora amiloide.....	29
<b>Figura 2-5:</b> Fotografía de especie <i>N. reticulata</i> en floración recolectada en el Pamplonita (Norte de Santander- Colombia).....	38
<b>Figura 5-1</b> Imagen representativa de la metodología.....	49
<b>Figura 6-1:</b> Efecto del extracto de <i>N. reticulata</i> en la memoria espacial evaluada por MWM después de 3 meses de tratamiento.....	51
<b>Figura 6-2:</b> Efecto del extracto de <i>N. reticulata</i> en las estrategias de navegación espacial de ratones en el MWM.....	52
<b>Figura 6-3:</b> Micrografías representativas de CA1.....	53
<b>Figura 6-4:</b> El tratamiento con el extracto de <i>N. reticulata</i> no modifica la carga amiloide tras el tratamiento.....	54
<b>Figura 6-5:</b> El tratamiento con el extracto de <i>N. reticulata</i> reduce la fosforilación Tau marcada con el anticuerpo AT8 en animales 3xTg-AD.....	56
<b>Figura 6-6:</b> El tratamiento con el extracto de <i>N. reticulata</i> incremento la expresión de ApoE en modelo 3xTg-AD.....	59
<b>Figura 6-7:</b> El extracto de <i>N. reticulata</i> incrementa los niveles de proteína ApoE en el hipocampo en modelo 3xTg-AD.....	62
<b>Figura 6-8:</b> El tratamiento con el extracto de <i>N. reticulata</i> reduce la astrogliosis en CA1 y CA3 en ratones 3xTg-AD.....	63
<b>Figura 6-9:</b> El tratamiento con <i>N. reticulata</i> no modifica la activación microglial en los animales 3xTg-AD.....	66
<b>Figura 6-10:</b> El extracto de <i>N. reticulata</i> no induce cambios en los vasos sanguíneos en los animales 3xTg-AD.....	70
<b>Figura 6-11:</b> El extracto de <i>Nectandra reticulata</i> disminuye la fosforilación de Tau en el hipocampo, sin modificar su expresión en modelo 3xTg-AD.....	73
<b>Figura 6-12:</b> El extracto de <i>Nectandra reticulata</i> disminuye los niveles de p25 en los animales 3xTg-AD.....	75
<b>Figura 6-13:</b> El extracto de <i>N. reticulata</i> disminuye significativamente la expresión de p-GSK3 $\beta$ en animales 3xTg-AD envejecidos.....	77
<b>Figura 7-1:</b> Efecto del agonista sintético GW3965 en la memoria espacial evaluada por MWM después de 3 meses de tratamiento.....	79
<b>Figura 7-2:</b> Efecto de GW3965 en las estrategias de navegación espacial durante la prueba de aprendizaje por MWM.....	81
<b>Figura 7-3:</b> Efecto de GW3965 en la expresión de ApoE en el hipocampo de animales 3xTg-AD.....	82
<b>Figura 7-4:</b> El agonista sintético GW3965 incrementa los niveles de Tau en el hipocampo en modelo 3xTg-AD.....	83
<b>Figura 7-5:</b> El agonista sintético GW3965 disminuye los niveles de p25 en los animales WT.....	85

<b>Figura 7-6:</b> El agonista sintético incrementa los niveles de expresión de GSK3 $\beta$ y reduce su fosforilación en animales 3xTg-AD envejecidos.....	<b>86</b>
<b>Figura 8-1:</b> Imagen representativa del gel de agarosa con metodología de blanqueo con subunidades ribosomales 28s y 18s. ....	<b>88</b>
<b>Figura 8-2:</b> Conteo de genes y correlación entre 3xTg-AD(Nr) y 3xTg-AD(Veh).....	<b>89</b>
<b>Figura 8-3:</b> Correlaciones normalizadas para los datos de los animales 3xTg-AD(Nr) y 3xTg-AD(Veh).....	<b>90</b>
<b>Figura 8-4:</b> Gráfica de estimación de dispersión para los datos de los animales 3xTg-AD(Nr) y 3xTg-AD(Veh).....	<b>90</b>
<b>Figura 8-5:</b> Conteo de genes y correlación entre 3xTg-AD(GW) y 3xTg-AD(Veh).....	<b>91</b>
<b>Figura 8-6:</b> Correlaciones normalizadas para los datos de los animales 3xTg-AD(GW) y 3xTg-AD(Veh).....	<b>92</b>
<b>Figura 8-7:</b> Gráfica de estimación de dispersión para los datos de los animales 3xTg-AD(GW) y 3xTg-AD(Veh).....	<b>92</b>
<b>Figura 8-8:</b> Volcano plot de genes expresados a la alza y la baja en los animales 3xTg-AD(GW) respecto a los 3xTg-AD(Veh).....	<b>93</b>
<b>Figura 8-9:</b> Heatmap de los 30 genes con mayor significancia estadística en los animales 3xTg-AD(GW) respecto a los 3xTg-AD(Veh).....	<b>94</b>

# Lista de tablas

	Pág.
Tabla 5-1:Diseño experimental de tratamientos.....	42
Tabla 5-2: Anticuerpo primarios para inmunofluorescencias.....	44
Tabla 5-1: Anticuerpos secundarios para inmunofluorescencias.....	44
Tabla 5-2:Anticuerpos primarios para Western blot.....	45
Tabla 3-5:Anticuerpos secundarios para Western blot.....	45
Tabla 8-1: Genes expresados diferencialmente y su categoría funcional para los animales 3xTg-AD(Nr) respecto a los animales 3xTg-AD(Veh).....	88
Tabla 8-2: Genes expresados diferencialmente a la alta y su categoría funcional para los animales 3xTg-AD(GW) respecto a los animales 3xTg-AD(Veh).....	92
Tabla 8-3: Genes expresados diferencialmente a la baja y su categoría funcional para los animales 3xTg-AD(GW) respecto a los animales 3xTg-AD(Veh).....	94



# Lista de Símbolos y abreviaturas

3xTg-AD	Modelo de ratón triple transgénico de EA
EA	Enfermedad de Alzheimer
ABCA1	ATP-binding cassette sub-family A member 1
A $\beta$	Beta amiloide
ANOVA	Análisis de varianza
ARRIVE	Reporting in Vivo Experiments
PS1	Presenilina 1
PS2	Presenilina 2
APP	Proteína precursora amiloide
AAC	Angiopatia amiloide cerebrovascular
BACE1	Beta secretasa-1
BHE	Barrera hematoencefálica
HDL	High-density lipoprotein (Lipoproteína de alta densidad)
APOE	Apolipoproteína E
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
Ach	Acetilcolina
AchEIs	Inhibidores de acetilcolinesterasa
GSK3 $\beta$	Glucógeno sintasa quinasa 3 beta
LXR	Receptor X hepático
SNC	Sistema Nervioso Central
PHF	Filamentos helicoidales emparejados
SF	Filamentos rectos
ABCA1	Transportador dependiente de ATP- 1
DG	Giro dentado (del Ingles Dentate gyrus)
SGZ	Zona subgranular (del ingles subgranular zone)
WB	Western-blot
GWAS.	Genome-wide association studies

# Capítulo 1. Planteamiento del problema

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la demencia más común a nivel global, con aproximadamente 46,8 millones de pacientes, cifra que continúa en aumento y estima un costo de 818 billones de dólares para el 2030. La EA afecta las funciones comportamentales, neurobiológicas y cognitivas de los pacientes. Esta enfermedad presenta en Colombia una prevalencia entre el 1.8% y 3.4% en la población entre los 65 y 75 años que corresponde aproximadamente a 221.000 pacientes. Según Prada y colaboradores (2014) el costo estimado del tratamiento por cada paciente en Colombia en un periodo de 8 años es de noventa y nueve millones de pesos (Prada, et al., 2014), gastos que se incrementarán al tiempo que incrementan la expectativa de vida y la prevalencia de sufrir la EA (Sánchez et al. 2010).

Considerando las problemáticas sociales y económicas que representa los altos índices de prevalencia de la enfermedad, alrededor del mundo se estudian las características genéticas, moleculares, patológicas, histológicas y epidemiológicas entre otras. Adicionalmente, las hipótesis más aceptadas de la enfermedad, fundamentadas en los marcadores histopatológicos A $\beta$  y Tau como ejes de la etiología de la enfermedad, han sido la base del diseño de las terapéuticas que han sido ineficaces, lo que hace más evidente la necesidad de investigar nuevas dianas moleculares y estrategias terapéuticas.

El grupo de investigación en Muerte Celular ha venido contribuyendo en la caracterización de la activación del receptor LXR como diana terapéutica para el tratamiento de la EA. En modelos murinos los agonistas de LXR reducen la carga amiloide al tiempo que mejora las funciones cognitivas. Adicionalmente, la activación de LXR incrementa la expresión de APOE y ABCA1 implicados en la producción de HDL, que ha sido asociado con el procesamiento de A $\beta$ . Así mismo, incrementa el marcaje de células madre neuronales (NSC), marcadores del linaje de mielina y oligodendrocitos, entre otros. En cooperación con el grupo de investigación Química de productos naturales vegetales bioactivos (QuiProNaB) se realiza la búsqueda y caracterización de moléculas con actividad biológica en plantas del territorio colombiano, con prioridad en la actividad agonista LXR y otras dianas moleculares clásicas como son los inhibidores de acetil colinesterasa, antiagregante de A $\beta$ , captadoras de radicales libres, entre otras.

Estos resultados son la base de la investigación y caracterización de nuevos agentes agonistas de LXR en la biodiversidad colombiana. Dentro de los resultados más relevantes se observó que el extracto de *Nectandra reticulata* tiene actividad agonista LXR en ensayos de gen reportero. En este proyecto de investigación se planteó estudiar los posibles cambios comportamentales, patológicos y moleculares mediados por el extracto de *Nectandra reticulata* y el agonista sintético de LXR (GW3965).

# Capítulo 2. Estado del Arte

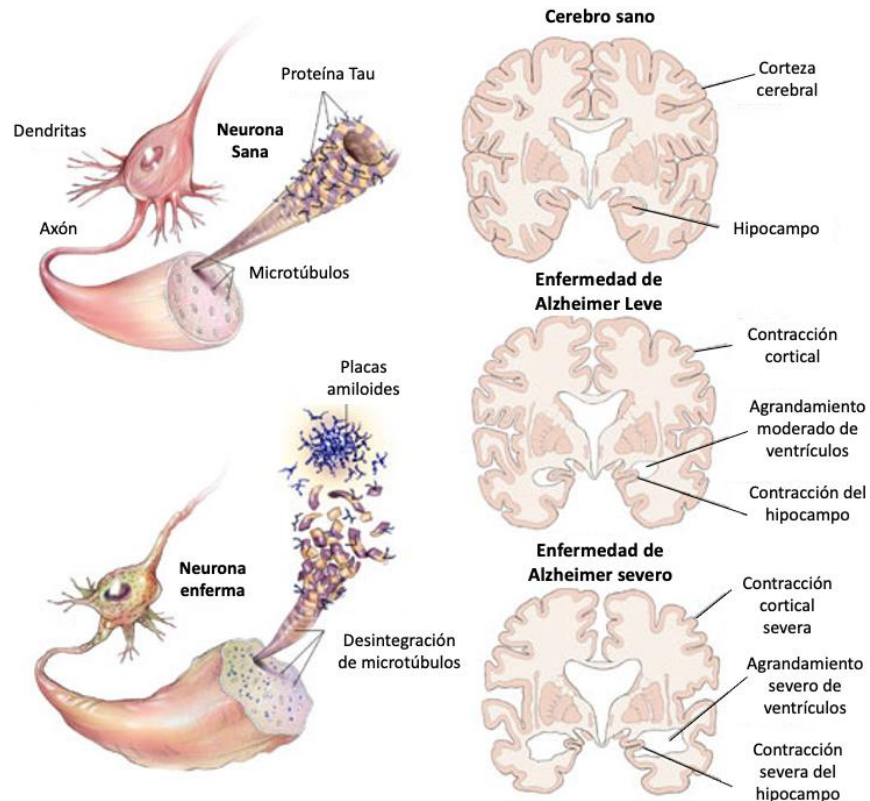
## 2.1 Enfermedad de Alzheimer

La EA es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por el deterioro de la cognición y el comportamiento, esta patología afecta a más de 50 millones de personas siendo la demencia más común en el mundo (Dos Santos Picanç, L., 2018; Cummings JL, 1992); esta cifra ha incrementado acorde al envejecimiento de las poblaciones debido a las tendencias demográficas y el incremento de esperanza de vida (Santos, CY., 2017). De acuerdo con el reporte Mundial de Alzheimer del 2021, para el año 2030 alrededor de 88 millones de personas vivirán con demencia costando 2 billones de dólares, estimando que estas cifras incrementarán hasta alcanzar 152 millones de personas con EA para el año 2050 (Alzheimer Disease International, 2021).

La EA fue descrita en el año 1907 por el neurólogo Alemán Alöis Alzheimer en Auguste Deter, una mujer de 51 años con deterioro de la memoria y otros trastornos cognitivos (Bondi, M W, 2017). Actualmente, se reconoce que la EA afecta aproximadamente al 5% de las personas mayores de 65 años, y el 20% de las personas mayores de 80 años, evidenciando el incremento en la prevalencia de la enfermedad respecto a la edad (Dos Santos Picanç, L., 2018).

La EA se caracteriza clínicamente por atrofia del hipocampo y la corteza cerebral (**Fig. 2-1**), que conducen a un patrón de déficits cognitivos relacionados con la memoria episódica, semántica, afasia (déficit en las habilidades del lenguaje), amnesia retrógrada, déficits visuoespaciales y de la atención, (Dos Santos Picanç, L., 2018; Bondi, M. W, 2017; Salmon et al., 2002) llevando a una dependencia total de terceros para realizar actividades de la vida cotidiana, producto de la dificultad para la deglución y la marcha (American Psychiatric Association; 1995).

**Figura 2-6.** Cambios morfológicos característicos de la EA en neuronas sanas y enfermas relacionados a la severidad de la enfermedad. (Tomado y adaptado de <http://www.alzheimerjerez.com/>)

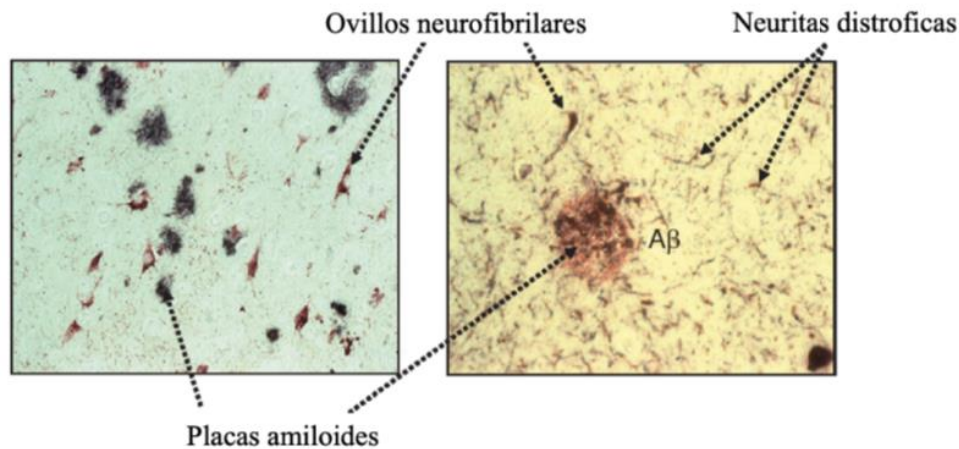


## 2.2 Aspectos moleculares y genéticos de la Enfermedad de Alzheimer

La EA se presenta de dos formas: **a)** De inicio temprano o familiar (EOAD: del inglés Early Onset Alzheimer's) antes de los 60 años, representa aproximadamente el 5% de los casos, generada por mutaciones de pérdida de sentido y herencia autosómica dominante en los genes que codifican para la Proteína Precursora Amiloide (APP), Presenilina 1 (PS1) y Presenilina 2 (PS2), y **b)** De inicio tardío o esporádica (LOAD: del inglés Late Alzheimer's), representa alrededor del 95% de los casos, es común en pacientes de alrededor de los 65 años y considerada una enfermedad de origen multifactorial, con un componente ambiental y genético. Ambas formas presentan afectación de la memoria a corto plazo, apatía, depresión y afasia (alteración del lenguaje) (Rujeedawa, T.,2021).

La EA es caracterizada por la presencia de dos tipos de agregados proteicos en regiones específicas del cerebro, péptidos  $\beta$ -amiloides (péptidos  $A\beta$ ) a nivel intracelular y agregados extracelulares denominados placas amiloides, los péptidos  $A\beta$  se encuentran tanto de forma libre (monómeros), como dímeros, trímeros y tetrámeros denominados oligómeros ( $\alpha A\beta$ ) y de protofibrillas, que son el componente principal de la placa compacta. El otro agregado es denominado como ovillos neurofibrilares, consiste en acumulaciones de la proteína Tau altamente fosforilada (Tau hiperfosforilada) presentándose principalmente a nivel intracelular (**Figura. 2-2**) (Rodríguez, E., 2017; Kosik, K., 1986).

**Figura 7-2** Marcadores histopatológicos de la EA. Placas amiloides y ovillos neurofibrilares. (Skaper SD., 2012)



Desde el punto de vista genético, se reconocen factores de riesgo determinantes y no determinantes que se relacionan con las dos presentaciones de la enfermedad. Estudios de asociación de genoma completo (del inglés GWAS: Genome-wide association studies) han reportado y confirmado a *APOEε4* como el principal factor de riesgo genético para padecer LOAD, otros variantes en genes como *TREM2* (receptor de activación expresado en células mieloides 2) (Cruchaga, C., 2013), *CLU* que codifica clusterina o apolipoproteína J, *CR1* que codifica el receptor 1 del componente del complemento (3b / 4b) (Lambert, J.C.: 2009), *PICALM* (proteína de ensamblaje de clatrina que se une a fosfatidilinositol) (Harold, D.; 2009), *GAB2* (gen de la proteína de unión asociada a GBRB2) con la EA, con portadores del gen *APOEε4* (Shen, L., & Jia, J., 2016). Actualmente se han reportado más de 38 loci de variantes genéticas de alta prevalencia con baja penetrancia donde se destacan genes asociados a la microglía, células inmunes y catabolismo de proteínas, sin embargo

recientes investigaciones predicen la existencia de 300 variantes que contribuirían al desarrollo de LOAD (Bertram, L., 2009; Wightman, D. P; 2021).

### **2.2.1 Proteína precursora amiloide (APP)**

La proteína precursora amiloide (APP) es una glicoproteína transmembranal perteneciente a la familia de proteínas conservadas de membrana tipo I. APP es altamente expresada en el cerebro y cumple funciones en sinaptogénesis, complejidad dendrítica, neurogénesis, orientación axonal, y otras funciones sinápticas, que se relacionan con la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria (Müller, U., 2017; Zhou, Z. D.,2011). Se han sugerido dada la similitud en la topología y el procesamiento proteolítico existente entre APP y la vía Notch, que APP podría funcionar como un receptor de membrana con ligandos como A $\beta$ , F-spondin, y nectrin-1 (Zhang YW, 2011).

APP presenta 8 isoformas que van desde 365 a 770 aminoácidos, de las cuales la isoforma APP695 carece del dominio Kunitz (KPI) inhibidor de proteasas, expresándose predominantemente en neuronas, siendo la principal fuente de APP en el cerebro (Bayer et al., 1999). APP tiene un papel crucial en la fisiopatología de la EA ya que su procesamiento proteolítico amiloidogénico resulta en la generación de los péptidos A $\beta$ , componente principal de las placas amiloides y base teórica de la hipótesis amiloide (Zheng, H, 2011).

El procesamiento amiloidogénico de APP se acelera cuando esta presenta mutaciones específicas tal como la mutación sueca (KM670/671NL), la cual causa un tipo de EA de tipo familiar de inicio temprano, esta mutación convierte a APP en un sustrato más específico de  $\beta$ -secretasa, lo que incrementa los niveles de A $\beta$  y sus consecuencias patológicas, incluyendo el incremento de la angiopatía cerebrovascular amiloide (AAC) (Wegger, S., 2012). Por otro lado, la mutación A673T identificada en la población islandesa tiene una asociación protectora respecto a la LOAD, esta mutación es adyacente en el sitio de reconocimiento de escisión de  $\beta$ -secretasa y en la posición 2 del producto proteolítico A $\beta$ . Se ha reportado que esta mutación reduce los niveles de sAPP $\beta$  y C99, al modificar el recambio catalítico de APP. Se ha determinado que los portadores de esta mutación presentan un 28% menos del monómero A $\beta$ 42 en plasma respecto a los no portadores (Guyon, A., 2020; Xia, Q.,2021).

### 2.2.2 Presenilina 1 (PS1) y Presenilina 2 (PS2)

Estas proteínas están altamente relacionadas con la EA de tipo familiar, las mutaciones en el gen *PSEN1* son causa de las formas más graves de EA con penetrancia completa y con una variabilidad de inicio probable desde los 25 años; en menor medida las mutaciones en el gen de la *PSEN2* presentan una edad más avanzada de inicio de los síntomas, alrededor de los 39 años. Las dos proteínas hacen parte del complejo catalítico de la  $\gamma$ -secretasa, encargada de procesar proteolíticamente proteínas de membrana, incluyendo APP; las mutaciones en estas proteínas conducen a un clivaje amiloidogénico de APP, incrementando la formación de fragmentos neurotóxicos de A $\beta$  (A $\beta$  1-42 y A $\beta$  1-40) (Van Cauwenberghe, 2017).

### 2.2.3 Apolipoproteína E (ApoE)

ApoE es una glicoproteína de 299 aminoácidos con un peso de 34 kDa, componente de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en el cerebro que se encarga del transporte de lípidos que incluyen colesterol esterificado, triglicéridos y fosfolípidos (Holtzman, 2015; Raulin et al., 2019). ApoE cumple funciones importantes en el crecimiento neuronal, reparación, inmuno-regulación y activación de enzimas lipolíticas, esta lipoproteína se encuentra ampliamente distribuida en órganos como el hígado, macrófagos, monocitos y cerebro donde es principalmente sintetizada por los astrocitos y microglía. Se ha descrito que ApoE cumple funciones homeostáticas del metabolismo de A $\beta$  en el cerebro, los cuales pueden requerir de la unión directa a HDL con péptidos o agregados de A $\beta$  para formar partículas HDL-A $\beta$  que serían transportadas y fagocitadas por la microglía (Pagani et al., 2011).

ApoE presenta 3 isoformas predominantes en humanos; ApoE2, ApoE3 y ApoE4 que se diferencian en dos residuos de aminoácidos en las posiciones 112 y 158, y que son codificadas por tres variantes alélicas  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 y  $\epsilon$ 4 respectivamente (Corder EH, 1993). El alelo  $\epsilon$ 4 es el factor de riesgo genético más importante para EA de inicio tardío y temprano. Estudios genéticos han mostrado que el efecto de riesgo se triplica para los portadores heterocigotos (*APOE $\epsilon$ 3/4*) mientras que para los portadores homocigotos (*APOE  $\epsilon$ 4/4*) se incrementa 15 veces (Strittmatter WJ, 1993). Por otra parte, el alelo  $\epsilon$ 2 tiene un efecto protector capaz de retrasar la edad de inicio (Farrer LA, 1997).

El mecanismo molecular por el cual las variantes de ApoE son un factor de riesgo o protección aun es parcialmente desconocido y puede deberse a su interacción e



intermediación con la eliminación de los péptidos A $\beta$ , en donde se considera que ApoE4 tiene la menor eficiencia y aunque solo el 20-25% de la población general tiene uno o dos alelos  $\epsilon$ 4, entre el 40-65% de los pacientes de EA son portadores de este alelo (Van Cauwenberghe,2017).

Diversos estudios han demostrado que ApoE tiene una relación molecular y homeostática con la patología Tau y la neurodegeneración, así como de la homeostasis microglial, la integridad de las sinapsis, el metabolismo de la glucosa y la función cerebrovascular (Yamasaki, 2019). Evidencia de esta relación ha sido observada en cerebros post-mortem de pacientes con los dos alelos *ApoE*  $\epsilon$ 4, que presentan mayor número de ovillos neurofibrilares en comparación con pacientes con uno o ningún alelo ApoE  $\epsilon$ 4 (Tiraboschi, P, 2004). Así mismo se ha demostrado en modelos murinos TauP301S que al expresar el alelo  $\epsilon$ 4 de *APOE*, se presenta mayor atrofia cerebral y neuroinflamación que animales que expresan los alelos  $\epsilon$ 2 o  $\epsilon$ 3 en comparación con sus controles, demostrando que la severidad de la patología Tau es dependiente de la isoforma de ApoE.

## 2.2.4 Tau

La proteína Tau es una fosfoproteína asociada a microtúbulos (MAP), esta codificada por el gen *MAPT* localizado en el cromosoma 17q21. Esta proteína tiene de 441 a 695 aminoácidos dependiendo de la isoforma, con un peso que oscila entre 45,9 a 72,7 kDa. Tau se expresa en neuronas y localizada principalmente en los axones, tiene funciones en la estabilización de los microtúbulos promoviendo el autoensamblaje de las subunidades de tubulina, está implicada en el transporte axoplásmico, diferenciación y polarización celular (Mandelkow, EM, 2012); al ser una fosfoproteína su actividad biológica está regulada por su grado de fosforilación.

Tau presenta seis isoformas generadas por un splicing alternativo, las cuales se diferencian entre sí por la presencia o ausencia de insertos de 29 aminoácidos cerca del residuo amino-terminal (0N, 1N o 2N) o presencia de 3(3R) o 4(4R) repeticiones de unión de microtúbulos en la región C-terminal (Guo, T., 2017). La expresión de las isoformas está regulada por el desarrollo, aunque las 6 isoformas se presentan en cerebros adultos sanos, sólo la isoforma más corta (0N3R) se presenta en el desarrollo fetal (Guo, T., 2017).

Tau es una proteína altamente hidrofílica, flexible y se encuentra normalmente desplegada, sin embargo, las interacciones intermoleculares entre sus dominios de motivos

hexapéptidos de las repeticiones 3 y 4 pueden inducir la formación de plegamientos y conformaciones de lámina- $\beta$  que funcionan como impulsores del autoensamblaje anormal de Tau (Guo, T., 2017), estas conformaciones pueden ser moduladas también por diferentes fosforilaciones (Alonso, A. D; 2018). En los cerebros de pacientes con EA se ha evidenciado un incremento de filamentos helicoidales, filamentos pareados u ovillos neurofibrilares, compuestos por proteína Tau hiperfosforilada lo que conduce a una inhibición del ensamblaje de microtúbulos (Iqbal, K.,2010)

### **2.2.5 Filamentos helicoidales emparejados y ovillos neurofibrilares**

Kidd y Terry en trabajos independientes en el año 1963, usando microscopia electrónica mostró que los ovillos neurofibrilares están formados por dos filamentos helicoidales anormales, actualmente conocidos como filamentos helicoidales pareados (PHF por sus siglas en inglés) (Šimić, G., 2016). Estos filamentos insolubles junto con filamentos rectos (SF, también por sus siglas en inglés) encontrados en menor proporción, están conformados principalmente por proteínas Tau hiperfosforilada lo que se relaciona con su polimerización ectópica y su autoensamblaje. (Braak H, 1986; Iqbal, K.,2010).

La proteína Tau que conforma el núcleo estructural de los ovillos neurofibrilares, presenta clivajes característicos en las regiones N y C terminal separados por 3 repeticiones y con un desplazamiento de 15 aminoácidos en comparación con las repeticiones nativas (denominado fragmento F3), lo que actualmente se considera la configuración característica de la interacción de unión Tau-Tau presente en los PHF de los núcleos de los ovillos. Este patrón no es susceptible de proteólisis por proteasas citosólicas, lo cual facilita su transporte y propagación a terminales axónicas, desestabilizando el citoesqueleto, lo que conlleva a una reducción de las proteínas presinápticas y al daño de la sinapsis (Wischnik C.M.,2014), este proceso tóxico se ha relacionado más estrechamente con eventos de muerte celular a diferencia de las placas amiloides.

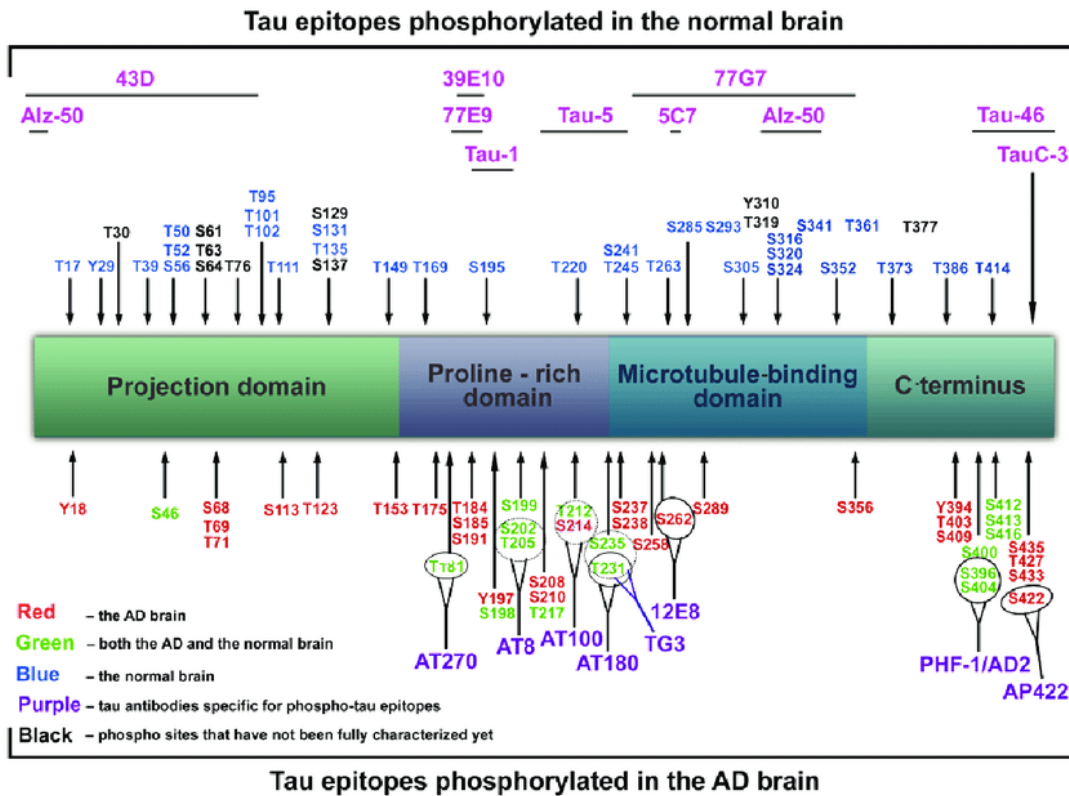
La propagación de los ovillos neurofibrilares inicia en la corteza transentorrinal, antes de extenderse al hipocampo anterior, pasando por la corteza límbica y temporal, la isocorteza de asociación y finalizando en la corteza sensorial primaria (Šimić, G., 2016; Santa-Maria, I.; 2012). Esta propagación tan característica de la taupatia presentada en la EA, ha llevado a plantear que la propagación de la patología se lleva a cabo a través de conexiones celulares (Vogel, 2020), donde la secreción de Tau anormal al espacio extracelular y

mecanismos para la captación celular de Tau plegada actúa como prion e impulsa la fosforilación y la agregación de la misma (Fuster-Matanzo, 2018)

## 2.2.6 Fosforilaciones de Tau

La fosforilación anormal de la proteína Tau es un evento neuropatológico que comparten algunas enfermedades neurodegenerativas, como la EA, en donde su fosforilación, agregación y proteólisis anormal es un evento temprano que se triplica en los pacientes en comparación con los controles (Šimić, G., 2016). Por lo cual, se ha utilizado como un marcador gradual del avance de la enfermedad en la estadificación neuropatológica de Braak (Braak H,1991).

**Figura 2-8** Sitios de fosforilación en los dominios de la proteína Tau en condiciones fisiológicas, de la EA y anticuerpos específicos de los epítopes. (Šimić, G., 2016)



La proteína Tau presenta 85 sitios susceptibles de fosforilación por quinasas, dentro de las cuales se han descrito: GSK3, Cdk5, Erk, JNK, CK1/2, DYRK1A, PKA, PKB, PKC, CaMKII, SFK y c-Abl. De los 85 sitios descritos, se han registrado 28 posiciones fosforiladas exclusivas en cerebros con EA (Martin, L.;2013).

La fosforilación aberrante de Tau que precede la formación de los ovillos neurofibrilares, se ha considerado un efecto secundario a la acumulación de A $\beta$ . Sin embargo, recientes estudios preclínicos de neuroimágenes funcionales, sugieren que la patología Tau progresa de forma independiente a la acumulación de A $\beta$ , y se relaciona más proporcionalmente con la neurodegeneración y el deterioro cognitivo (van der Kant, 2020). La importancia de la relación entre la taupatía con el deterioro cognitivo en la EA ha llevado al establecimiento de potenciales estrategias terapéuticas para evitar la fosforilación, agregación y transferencia intracelular de Tau, así como la estabilización de los microtúbulos (Gu, 2020).

### **2.2.7 Quinasas de Tau y su relación con la Enfermedad de Alzheimer**

Dada la importancia de la fosforilación anormal de Tau en la EA, un gran número de estudios evalúan sus quinasas, las más investigadas han sido las quinasas dirigidas al dominio rico en prolina como la Glucógeno sintasa quinasa 3  $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) y la quinasa dependiente de ciclina 5 (CDK5) (Martin, L., 2013).

GSK3 presenta dos isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  altamente homólogas. La isoforma  $\beta$ , se presenta en forma  $\beta$ 2 y  $\beta$ 1 localizadas en el soma neuronal y extensiones axonales respectivamente (Mukai, F., 2002). GSK3 $\beta$  fosforila Tau en 42 residuos, de los cuales 29 son sitios fosforilados en cerebros con EA (D.P. Hanger, 2009). El papel de GSK3 $\beta$  en la EA, ha sido de gran interés ya que en cerebros post mortem de pacientes con EA colocaliza con ovillos neurofibrilares (J.J. Pei, 1997). Se ha reportado que la forma activada de p-GSK3 $\beta$  (Tyr 216) se encuentra aumentada en la corteza frontal. Se ha relacionado su incremento con la hiperfosforilación de Tau, la neurodegeneración en el hipocampo, el déficit de memoria, la respuesta inflamatoria, el aumento de la producción de A $\beta$  y la síntesis reducida de acetilcolina (Hoshi, M., 2009).

Uno de los inhibidores de GSK3 $\beta$  es el litio, el cual ha sido utilizado en el tratamiento de trastornos bipolares y de depresión. Se ha observado que en animales Tg30tau lo cuales desarrollan una patología neurofibrilar grave, el tratamiento prolongado con litio (uno y ocho

meses) reduce la fosforilación de Tau y la formación de agregados insolubles en el cerebro y en la médula espinal, además de reducir la formación de ovillos neurofibrilares en el hipocampo y medula espinal (Leroy, K.; 2010). Adicionalmente, ensayos preclínicos demostraron que suministrar una dosis de 300 µg de litio diariamente durante 15 días previene la pérdida cognitiva a pacientes con EA (Nunes, M. A.; 2013), sin embargo la evidencia no es del todo concluyente ya que algunos estudios clínicos se han interrumpido por presentar perfiles de inseguridad intolerables o no cumplir con los criterios de valorización frente al deterioro cognitivo (Snitow, M.E; 2021).

Por su parte, CDK5 es una enzima esencial, cuya expresión está restringida al SNC. Está implicada en la regulación del citoesqueleto neuronal, crecimiento neurítico y actividad sináptica (Samuels, B.A. 2007). CDK5 es regulada por la interacción con las subunidades p35 y p39 en los residuos de Treonina y Serina en la quinasa. CDK5 fosforila 11 residuos de la proteína Tau presentes en cerebros de pacientes con EA (Martin L., 2013), es regulada por la proteína p25 formada a partir del clivaje de la proteína p35 a partir de a formación del complejo CDK5/P25, asociado con el incremento de la fosforilación de Tau y la neurodegeneración (Cruz, J. C, 2003), Se ha observado en cerebros de pacientes con EA que este complejo se encuentra aumentado, así como la relación p25/p35 (Camins, A., 2006). Adicionalmente CDK5 promueve la fosforilación de Tau por parte de GSK3β (Engmann, O.;2009)

La inhibición farmacológica con oscovitina o genética de CDK5 ha mostrado en modelos *in vitro* como *in vivo*, un rescate de la maduración y crecimiento de neuritas, mejora de la neurogénesis, mantenimiento de la integridad de los NPC y la maduración neuronal en el hipocampo (Crews, L.; 2011). En modelos 3xTg-AD, el knock-down de CDK5 en el hipocampo usando terapia génica con shCDK5miR en una única dosis, 1 año después de la inyección, mostró disminución de la expresión de CDK5, reducción de la formación de Tau insoluble en el hipocampo y mejoría en la memoria espacial (Castro-Alvarez, J. F; 2014). Adicionalmente, el knock-down de CDK5 en astrocitos se asoció con mejoría de la integridad neurovascular, neuroprotección después de la excitotoxicidad inducida por glutamato, restauraron la homeostasis del calcio y reagrupación sinapsina y PSD95 (Toro-Fernández, L.F.; 2021). Estos datos sugieren un efecto de CDK5 sobre los procesos neurodegenerativos asociados a la neurona y la neuroprotección asociada a la propagación del calcio mediada por el astrocito.

## 2.3 Hipótesis moleculares

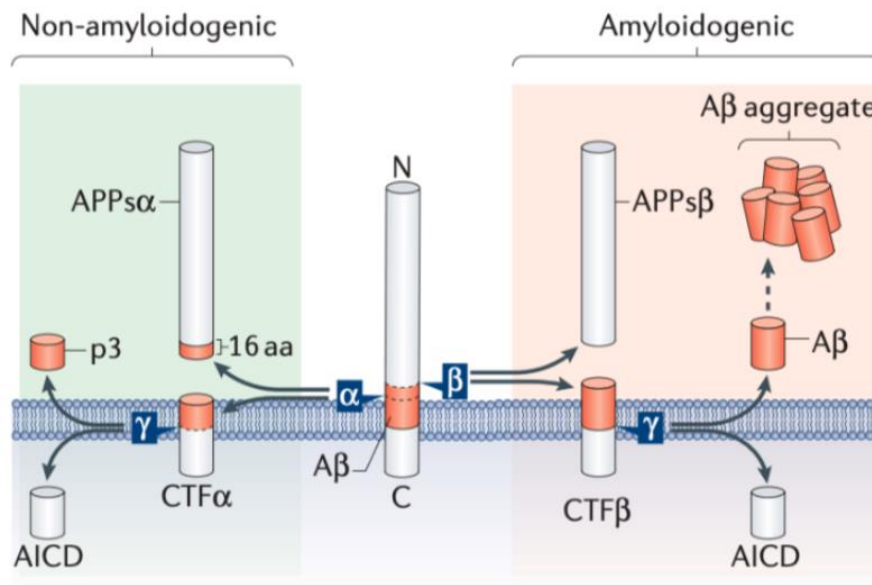
Desde la descripción de la enfermedad y características fisiopatológicas se han desarrollado un gran número de investigaciones que intentan descifrar los mecanismos moleculares y neurobiológicos que describan la patología, en la actualidad se reconocen varias hipótesis, incluyendo la hipótesis amiloide, la hipótesis colinérgica, entre otras, que se relacionan y conllevan a los déficits cognitivos de la EA (Monge-bonilla, 2017).

### 2.3.1 Hipótesis amiloide

Esta hipótesis surge de 3 mutaciones en el codón 171 encontradas en el año 1991 en el gen *APP* en familias con EA de inicio temprano (Mccaddon, 2019), estas mutaciones en *APP*, *PS1* y *PS2* predisponen al clivaje amiloidogénico de *APP*, la acumulación y oligomerización de péptidos A $\beta$  los cuales se depositan progresivamente como oligómeros formando posteriormente placas amiloides (Weggen; 2012). La hipótesis de la cascada amiloide postula que el procesamiento amiloidogénico de *APP* genera la aparición de péptidos A $\beta$  que dan inicio a los eventos patogénicos característicos de la EA (Hardy, S., 2002).

*APP* puede ser procesada de manera patogénica y no patogénica (**Figura. 2-4**). La vía patogénica es denominada vía amiloidogénica, este procesamiento inicia con el clivaje de *APP* producido por  $\beta$ -secretasa (*BACE1*) y continuando con  $\gamma$  secretasa, del procesamiento se produce un fragmento sAPP $\beta$  y el péptido A $\beta$ . Por otro lado la vía no patogénica implica el clivaje de *APP* por la  $\alpha$ -secretasa seguido de  $\gamma$ -secretasa produciendo un péptido sAPP $\alpha$  soluble asociado a la neuroprotección y un fragmento p3 (Gralle, 2006; Hashioka, 2005). Se ha determinado que el procesamiento amiloidogénico de *APP* sucede en microdominios de la membrana ricos en colesterol y esfingolípidos denominados “balsas lipídicas”, asociado con la expresión localizada de  $\beta$ -secretasa (Simons, 2002). La hipótesis de la cascada amiloide postula también que los agregados de los péptidos de A $\beta$  inician los eventos patológicos característicos de la EA como la hiperfosforilación de la proteína Tau, la inflamación, la distrofia de las neuritas, lo cual conlleva finalmente a disfunción sináptica y muerte neuronal (Hardy, S., 2002)

**Figura 2-9** Vías canónicas del procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP) (Müller, U., 2017).



### 2.3.2 Hipótesis colinérgica

La hipótesis colinérgica postula que la disfunción de las neuronas que contienen acetilcolina en el cerebro contribuye sustancialmente al deterioro cognitivo observado en personas con edad avanzada y enfermedad de Alzheimer (EA) (Terry, A.V.; 2003). Fue la primera hipótesis propuesta para explicar la pérdida de habilidades cognitivas en la EA, ha llevado al desarrollo de medicamentos aprobados para tratar la enfermedad en estado leve a moderado (Bartus, 2000; Bartus et al., 1982). La teoría está basada en la pérdida de actividad colinérgica en los cerebros de pacientes con la EA en etapas tempranas de la enfermedad en el núcleo basal y en la corteza entorrinal, la cual aumenta hasta alcanzar una pérdida superior al 90% de las neuronas colinérgicas en las etapas posteriores. (Davies, 1976; Perry., 1981). Esta hipótesis también explica la disfunción y muerte neuronal de redes de transmisión específica que conducen a la deficiencia de ACh, noradrenalina y serotonina.

Estudios en humanos y primates mostraron que el bloqueo de la vía colinérgica central por escopolamina en sujetos jóvenes produce déficits en la memoria similar a los observados

en individuos envejecidos, cuya disfunción fue revertida con fisostigmina un agonista colinérgico (Bartus, 1978; Drachman, 1977; Drachman, 1974).

A pesar de que la terapéutica con inhibidores de Ach producen mejoría cognitiva en etapas leves de la enfermedad, la EA continúa su progresión hacia la degeneración neuronal y de los patrones cognitivos, lo que ha llevado a explorar estrategias farmacológicas dirigidas a otros marcadores relacionados con la fisiopatología de la enfermedad (Dos Santos Picanç, L., 2018).

### **2.3.3 Hipótesis hiperfosforilación de Tau**

Como ya se mencionó los ovillos neurofibrilares son uno de los marcadores histopatológicos de la EA, cuyo componente principal es la proteína Tau hiperfosforilada. La hipótesis establece que la fosforilación excesiva o anormal de Tau da como resultado la transformación de Tau normal en PHF-tau y NFT, lo que produce la neurodegeneración y la demencia (Mohandas, E., 2009). Inicialmente la taupatía aparece en áreas concretas, sin embargo, se extiende a otras regiones del cerebro (Liu, P., 2019), este comportamiento conllevó a proponer la hipótesis de propagación de Tau que postula que Tau extracelular agregada entra en las células y transmite un estado de plegado incorrecto específicamente a la Tau intracelular (Frost, B., 2009) en un comportamiento tipo priónico donde eventualmente Tau mal plegado se disemina y agrega a través del cerebro de los pacientes con EA (Liu, PP., 2019).

### **2.3.4 Hipótesis inflamatoria**

Los procesos neuroinflamatorios son importantes en la EA, algunos estudios han demostrado que la hiperfosforilación anormal de Tau y la subsiguiente formación de ovillos neurofibrilares incrementan drásticamente como producto de procesos inflamatorios agudos y crónicos (Liu, P., 2019). La hipótesis inflamatoria tomó fuerza en 1990, cuando estudios epidemiológicos mostraron que el tratamiento a largo plazo con antiinflamatorios usados en enfermedades como la artritis reumatoide, presentaban un efecto protector hasta del 50% de desarrollar la EA (Kinney, JW.,2018; Wyss-Coray, 2002).



La inflamación en las regiones del cerebro tiene una función dual, por una parte un efecto neuroprotector en etapas agudas, que progresa a un efecto deletéreo en eventos de respuesta crónica, y que en el contexto de la EA exacerba la carga de A $\beta$  y la hiperfosforilación de Tau (Kim Y.S.,2006). La activación prolongada de la respuesta inmune genera microgliosis reactiva (Kinney, J. W., 2018). Esta sobre-activación impediría a la microglía unirse y fagocitar A $\beta$ , impidiendo su capacidad para descomponer las placas amiloides (Krabbe G., 2013). Por otro lado, la activación sostenida de la microglía conduce a niveles elevados de la interleuquina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), aumenta la producción de otras citoquinas y estimula la activación de CDK5 (Quintanilla R.A., 2004).

La señalización proinflamatoria está mediada por algunas citoquinas como Factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-6, factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF $\kappa$ B), interleuquina 10 (IL-10) y factor de crecimiento transformante beta 1(TGF-  $\beta$ 1), las cuales juegan un papel importante en la enfermedad (Kinney, J. W., 2018). TNF- $\alpha$  es una de las citoquinas más importantes en el proceso inflamatorio de la EA, se ha observado que se encuentra en niveles elevados en cerebro y plasma en pacientes, dado que desempeña un papel central en el inicio y regulación de la cascada inflamatoria (Akiyama H., 2010). A pesar de la evidencia de la importancia de la regulación del proceso inflamatorio, los ensayos clínicos con antiinflamatorios han mostrado evidencia variable sin un beneficio consistente. Sin embargo, neuroinflamación juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad. (Du X, 2018).

## **2.4 Receptores Nucleares (RN) y EA**

Los receptores nucleares son una súperfamilia de proteínas, que en los humanos cuenta con 48 miembros descritos. Estas proteínas son factores de transcripción que regulan la expresión génica a través de la formación funcional de heterodímeros que son activados por la unión de su ligando (Mazaira, G.I, 2018). Se encuentran implicados en procesos de proliferación celular, desarrollo embrionario, metabolismo y reproducción (Ulrich, 2003). La estructura presenta el dominio de unión al ADN (DBD) y el dominio de unión al ligando (LBD), responsables de la unión a secuencias específicas de ADN y de la unión a sus ligandos (Evans RM, 1988). Un dominio menos conservado es el dominio de transactivación (TD o AF-1) el cual se une a otros factores de transcripción o coactivadores (Rastinejad F, 2013).

La versatilidad de los RN ha permitido que más del 13% de fármacos aprobados por la FDA tengan como diana terapéutica su regulación (Sever, R., 2013). Teniendo en cuenta su importancia en la regulación de múltiples genes, el efecto de la activación de algunos RN en procesos como el metabolismo de lípidos, ha llevado a evaluar su efecto en modelos animales y celulares de la EA, obteniendo resultados prometedores para el receptor X hepático (LXR) y del receptor X retinoide (RXR) (Mawuenyega, 2010).

Los LXRs pertenecen a los RN de clase II, los cuales forman heterodímeros funcionales con RXR para regular la transcripción génica, entre sus funciones fisiológicas son capaces de regular procesos de señalización de lípidos, colesterol y glucosa (Korach A., 2015). La subfamilia LXR está compuesta por dos isoformas, LXR $\alpha$  que se expresa en órganos involucrados con el metabolismo de lípidos como el hígado, el tejido adiposo y los macrófagos, y LXR $\beta$  que se expresa en el sistema inmune, células de la glía del sistema nervioso central, páncreas, en músculo esquelético y en el epitelio prostático (Lund, E.G., 2006).

Los LXR se activan tras la heterodimerización con RXR inducida por ligandos de LXR (oxiesteroles) o RXR (ácido 9-cis-retinoico). Los blancos transcripcionales de LXR incluyen el gen de ApoE y del transportador de colesterol ABCA1, modulando el metabolismo cerebral del colesterol (Liang et al., 2004). La activación de este receptor en hepatocitos incrementa la expresión de la ácido graso-sintasa, lipoprotein-lipasa, proteína de transferencia de éster de colesterol, proteína de unión al elemento regulador del esteroil (SREBP-1c) y proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP) entre otras (Rong,S., 2017).

RXR se homodimeriza consigo mismo o con otros RN como LXR, la heterodimerización proporciona un mecanismo para integrar dos vías de señalización de ligandos distintas. El heterodímero es fuertemente activado por ligandos para cualquiera de los RN involucrados en el dímero lo que puede producir efectos aditivos o sinérgicos en la actividad transcripcional de los RN (Kojetin, D., 2015). El tratamiento con bexaroteno, un agonista del receptor RXR en el modelos quintuple transgénicos de la EA (5xFAD) produjo mejoría cognitiva asociada a la reducción de la carga amiloide y de la pérdida neuronal, incremento de los niveles de proteína de densidad postsináptica 95 (PSD95) y sinaptofisina, reducción de la astrogliosis y de la expresión de genes proinflamatorios (Mariani, MM., 2017). Otro

estudio en animales 3xTg-AD reportó que el bexaroteno produjo mejoría cognitiva, reducción de la astrogliosis y microglia reactiva en hipocampo y corteza, aumentó los niveles de ApoE en CA1 del hipocampo, incremento en el marcaje de NeuN, recuperación de la transmisión y la plasticidad sináptica (Muñoz-Cabrera, J.M., 2019). Adicionalmente, incremento el marcaje del linaje de mielina, y el número de oligodendrocitos mitóticos y mielinizantes maduros en animales envejecidos (Santos-Gil, D.F.,2021).

### **2.4.1 Ligandos de LXR**

Los oxisteroles son ligandos endógenos del receptor LXR, algunos de estos son el 24(S)-hidroxicolesterol o cerebrosterol y 27-hidroxicolesterol, los cuales son derivados oxidados del colesterol que inducen la expresión de ABCA1, LPL, ABCG5 y ABCG8. Un segundo tipo de oxisteroles provienen de la biosíntesis del colesterol como el 24 (S), 25-epoxicolesterol, el cual aumenta la expresión de ABCA1 (Komati, R., 2017). Los ligandos endógenos son obtenidos de reacciones enzimáticas y no-enzimáticas por oxidación por especies reactivas de oxígeno (ROS) y también por fuentes alimenticias (Wojcicka et al. 2007). Adicionalmente, se ha observado que la glucosa y glucosa-6-fosfato se unen a LXR $\alpha$  y LXR $\beta$ , lo que induce la transcripción génica de genes blanco de estos receptores (Mitro, 2007).

Respecto a los agonistas sintéticos, se han desarrollado y caracterizado moléculas como el T091317 y el GW3965, lo cuales presentan afinidad diferencial frente a los receptores, por un lado, T091317 es también agonista de los receptores FXR y PXR, mientras que GW3965 es un agonista específico LXR $\alpha$  y LXR $\beta$ . Este agonista sintético se une con afinidades diferenciales a las isoformas de LXR, para LXR $\alpha$  la afinidad de unión al receptor es de pKi 6.8 mientras que para LXR $\beta$  es de 7.62 (Belorusova, A.Y.; 2019), han sido evaluados como alternativa terapéutica en modelos murinos de la EA, produciendo cambios moleculares y celulares (Loren, J. , 2013).

### **2.4.2 Efecto de la activación de LXR en la EA**

Los blancos transcripcionales de LXR son muy amplios, incluye la regulación de la expresión de APOE y ABCA1 implicadas en el metabolismo de A $\beta$  (Mandrekar-Colucci, 2011). La administración de los agonistas sintéticos GW3965 y T091317, en modelos

murinos transgénicos de la EA como el 3xTg-AD y APP23 han producido efectos sobre la patología amiloide e inflamatoria.

El agonista T091317 a una dosis de 50 mg/kg/día durante 6 días en ratones APP23 de 11 semanas, incrementa la expresión de ABCA1, reduce los niveles de A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 solubles, modula el procesamiento de APP hacia  $\alpha$ -Secretasa en lugar de BACE1 (Koldamova; 2005). Usando una dosis de 30 mg/kg/día durante 6 días en ratones APPSLxPS1mut de 21 meses, modifica el metabolismo del colesterol y restaura el deterioro cognitivo sin cambios detectables de la patología amiloide (Vanmierlo et al. 2011).

Respecto al agonista de LXR GW3965 su administración en ratones Tg2576 de 12 meses de edad una dosis de 33 mg/kg/día durante 4 meses, incrementó los niveles de ApoE y ABCA1, la degradación proteolítica de A $\beta$  reduciendo la carga amiloide A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 y las placas amiloides. Una dosis de 50 mg/kg/día por 6 días en ratones de 20 meses de edad revertía el deterioro cognitivo (Jiang et al. 2008). Adicionalmente, el GW3965 reduce la expresión de proteínas proinflamatorias en ensayos *in vitro* e *in vivo*, además de incrementar la expresión de ApoE, ABCA1, ABCG1, ApoC2, SREBP1 (Zelcer et al. 2007).

Donkin y colaboradores (2010) demostraron que usando el agonista GW3965 en una dosis de 33 mg/kg/día en ratones APP/PS1, incrementaba ABCA1 y ApoE. Adicionalmente animales APP/ PS1 tratados con dosis 2.5 y 33 mg/kg/día de GW3965 mostraron una reducción de la carga de amiloide en hipocampo y corteza cerebral y una restauración de la memoria de reconocimiento de objetos a niveles de ratones de tipo salvaje esto dependiente de ABCA1 (Donkin,J.J., 2010).

En animales 3xTg-AD, se demostró que el uso del agonista GW3965 a dosis de 33 mg/kg/día durante 12 semanas, mejora el aprendizaje, retención y transferencia en el laberinto acuático de Morris, se incrementa significativamente la expresión de las proteínas ApoE y ABCA1 en el hipocampo, reduce la astrogliosis, recupera el número de células madre neuronales y la proliferación celular en DG del hipocampo (Sandoval- Hernández A.G, 2015).

## 2.5 Alternativas terapéuticas

Actualmente, existen fármacos aprobados que tienen efecto sobre los síntomas sin modificar efectivamente la progresión y patología, entre estos encontramos los inhibidores de la colinesterasa como la tacrina, donepezilo, rivastigmina y galantamina, además un bloqueador no competitivo del receptor NMDA como la memantina (Briggs, R., 2016). Sin embargo el componente multifactorial de la enfermedad hace necesario el desarrollo de fármacos multiobjetivos para inhibir múltiples factores implicados en la EA (Sharma, K., 2019).

El enfoque terapéutico alrededor de la EA, se han fundamentado en las hipótesis previamente mencionadas, centrándose en prevenir, reducir y regular la formación de las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares. Específicamente, la terapéutica asociada a la hipótesis amiloide, ha contribuido al desarrollo de inhibidores  $\gamma$ -secretasa y  $\beta$ -secretasa o la inmunoterapia, un ejemplo de esta estrategia es el fármaco Solanezumab, un anticuerpo monoclonal dirigido al dominio del péptido A $\beta$ , modificando el equilibrio entre las especies solubles e insolubles de A $\beta$  (Honig, L.S.,2018). Recientemente, la FDA aprobó el Aducanumab (de nombre comercial Aduhelm) un anticuerpo dirigido al péptido A $\beta$ , que según sus desarrolladores al suministrarse a pacientes con deterioro cognitivo leve (DCL) reduce la progresión del deterioro cognitivo. Sin embargo, un gran número de expertos contradicen los posibles efectos del fármaco y sus hallazgos relacionados con la disminución de las placas amiloides (Høilund-Carlsen, P. F.,2021).

En cuanto al abordaje terapéutico desde la taupatía, se han formulado inhibidores de la agregación de Tau, inhibidores de la expresión o activación de quinasas asociadas a Tau como GSK3 $\beta$  y CDK5 (Lau, L. F.,2002, Allnutt, A. B, 2020; Avila, J. 2007), Por ejemplo el metiltioninio, un inhibidor de la agregación de Tau probado en un ensayo clínico, que mostró leves modificaciones en la cognición de los pacientes con EA leve (Gauthier, S.; 2016).

Este panorama desalentador, hace necesario evaluar otros enfoques terapéuticos que incluyan una visión más amplia de la compleja EA. El potencial terapéutico de la activación de los receptores nucleares como LXR y RXR mencionado previamente y la evidencia creciente de la capacidad de productos naturales provenientes de plantas y hongos para incrementar la activación de LXR, como los fitoesteroles (ergosterol, brassicasterol,

campesterol,  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol y fucosterol) (Plat, J., 2002; Plat, J. 2005), amplían la posibilidad de desarrollar nuevas terapias para la EA.

## 2.6 Productos Naturales vegetales y la EA

La amplia diversidad molecular en metabolitos bioactivos presentada en los productos naturales han tomado una creciente importancia en el desarrollo de estrategias farmacológicas (Panda, S. S., 2020). Los extractos de plantas contienen moléculas producidas en un ambiente biológico que debido a su origen contienen grupos funcionales que facilitan la interacción con múltiples proteínas de manera específica, al ser mezclas complejas podrían actuar sobre múltiples dianas moleculares en la EA.

Recientemente, han incrementado las publicaciones de moléculas provenientes de productos naturales como flavonoides, fenoles, saponinas, glucósidos, alcaloides y los terpenoides, con efecto neuroprotector en las enfermedades neurodegenerativas (Shal, B.,2018). Un ejemplo es la curcumina un colorante que hace parte de la cúrcuma, mejora la disfunción cognitiva al modular vías inflamatorias, disminuye la carga de radicales libres, quela iones metálicos e inhibe la agregación de A $\beta$  (Ayaz, M., 2019).

El género *Nectandra* hace parte de la familia *Lauraceae*, con aproximadamente 3000 especies, sobre las cuales se han reportado actividades biológicas como; antifúngico, antidiarreico, analgésico, antirreumático, antiinflamatorio, antipirético e hipotensor. Esta familia contiene metabolitos que incluyen sesquiterpenos, fitoesteroles, polialcoholes, flavonoles, arilpropanoides, lignanos de furofurano, neolignanos de dihidrobenzofurano (Barbosa-Filho, 1989), alcaloides y taninos (Moreno SR,2007). El género *Nectandra* se considera endémico del neótropico, con una amplia distribución en Sudamérica, especialmente en Brasil y Colombia (Macías-Villamizar, V.E.,2015), dentro de este género se encuentra la especie *Nectandra reticulata* (**Figura 2-5**), especie de árbol de 9 metros, de corteza externa café terracota, interna amarilla, aromática y con flores color crema con tomento ferrugíneo (Jardín Botánico José Celestino Mutis, 2021).

**Figura 2-10:** Fotografía de especie *N. reticulata* en floración recolectada en Pamplonita (Norte de Santander- Colombia) (Herbario JBB en línea - Jardín Botánico José Celestino Mutis.)



## 2.7 Modelo Animal Triple transgénico de la Enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD)

El modelo murino 3xTg-AD expresa 3 transgenes humanos, APP<sup>Swe</sup>, MAPT P301L, y PS1M146V relacionados con la EA de tipo familiar (Oddo et al. 2003). La mutación APP<sup>Swe</sup> (KM670/671NL), corresponde con una doble mutación en los residuos 670 y 671 de la isoforma humana de APP (isoforma 770), específicamente en el residuo 670 se sustituye una Lisina (K) por Metionina (M), y en el 671 se sustituye una Asparagina (N) por una Leucina (L), en el extremo N-terminal de APP, sitio de escisión de  $\beta$ -secretasa aumentando de 5 a 10 veces más la producción y secreción de A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 (Mullan, M; 1992; Thordardottir, S, 2017). La mutación MAPT P301L, es una mutación de cambio de sentido donde se sustituye una Prolina (P) por una Leucina (L), ocurre en una región altamente conservada de la secuencia de Tau en el exón 10, por tanto, afecta exclusivamente a las isoformas de 4 repeticiones (4R); esta mutación acelera la formación de hojas  $\beta$  durante la agregación y conduce a la formación de filamentos helicoidales pareados (von Bergen M., 2001).

La mutación PS1M146V, es una mutación de pérdida de sentido en el exón 5 donde se sustituye la metionina (M) en el residuo 146 por una Valina (V), provoca el incremento y

secreción de A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 (Duff K,1996). Estos transgenes en el modelo 3xTg-AD se restringen al sistema nervioso central principalmente en corteza e hipocampo al estar regulados bajo el elemento regulador Thy1.2 específico de neuronas. De acuerdo a la cronología del fenotipo estos animales generan acumulación progresiva de A $\beta$  detectable a los 6 meses en la corteza frontal y ovillos neurofibrilares a partir de los 12 meses en el hipocampo. Estos agregados conducen a la disfunción sináptica y deterioro cognitivo observado a los 4 meses, posiblemente por la presencia de A $\beta$  intraneuronal (Billings et al. 2005); ensayos de comportamiento del Laberinto de Barnes indican que este modelo animal muestra insuficiencias en procesos de aprendizaje y memoria a partir de los 6 meses de edad (Stover et al. 2015). Estas modificaciones neuropatológicas, sinápticas y bioquímicas ampliamente caracterizadas hacen de este animal un modelo adecuado para el estudio molecular y celular de la EA.



## Capítulo 3. Justificación

Alois Alzheimer describió el primer caso de la EA como una causa inusual de demencia en adultos (Karlawish et al. 2017), sin embargo, en la actualidad es la demencia más común en el mundo. La EA no cuenta con terapia preventiva ni curativa. Según el reporte de la Alzheimer's Association en el año 2021 el gasto público generado por el cuidado de la enfermedad representó 11.8 mil millones de dólares solo en los Estados Unidos, gasto que supera enfermedades cardiovasculares y cáncer; esto preocupa a las entidades de salud pública en el mundo ya que la tendencia continúa en aumento, y más en países en vías de desarrollo, sumado a esto la International Classification of Diseases (ICD) demostró que la enfermedad es la sexta condición de mortalidad a nivel global.

Los desarrollos farmacológicos siguen apuntando a la remoción de los oligómeros y placas A $\beta$ , sin embargo, en estudios recientes con Tomografía por Emisión de Positrones (PET) han encontrado que la evolución espacio-temporal de la patología Tau y A $\beta$  es diferencial. La acumulación de péptidos A $\beta$  inicia en la neocorteza y se propaga a la allocorteza y el tronco encefálico, mientras que la Tau patología inicia en la corteza entorrinal, y se extiende hacia a áreas límbicas y por último al neocortex, a esta diferenciación se le conoce como la “paradoja espacial”, que se relaciona además con presencia previa de placas amiloides 10 a 20 años antes de los signos clínicos de la enfermedad y se atenúa en las últimas etapas, por otro lado, la acumulación de ovillos neurofibrilares empeora en las etapas avanzadas (van der Kant, 2020).

A lo largo de los años se han desarrollado estudios en búsqueda de terapias farmacológicas, sin embargo no han logrado buenos resultados, la comunidad científica actualmente considera que existe un gran desconocimiento de varios de los cambios moleculares inmersos en la EA los cuales serían fundamentales para comprender las causas y determinar una posible solución. Actualmente, se sugiere que la mejor estrategia farmacológica debe abordar múltiples dianas moleculares además de los marcadores histopatológicos, entre estas otras dianas se incluyen procesos inflamatorios, daño de la barrera hematoencefálica (BHE), la acumulación de proteínas mal plegadas y la acumulación de ROS.

Algunos de los fármacos que han mostrado resultados prometedores en modelos murinos de EA son los agonistas sintéticos de LXR y RXR. Los tratamientos farmacológicos con estos ligandos sintéticos producen cambios de expresión de genes, inducen regeneración

a nivel de tejidos cerebrales y producen mejoría cognitiva. Por esta razón es de interés la búsqueda de moléculas agonistas de LXRs como agentes prometedores en el desarrollo de una estrategia farmacológica para la EA. Previamente en el grupo de investigación se ha evaluado el efecto antioxidante, inhibidor de acetilcolinesterasas, anti-agregante de A $\beta$  y neuroprotector frente a diferentes neurotoxinas de extractos de plantas colombianas en modelos celulares. Uno de los extractos promisorios fue el extracto etanólico de hojas de *Nectandra reticulata*, que en células HEK293 mostró actividad agonista del LXR mediante el ensayo de gen reportero, por lo cual se consideró realizar la evaluación de su actividad y su efecto en los marcadores histopatológicos presentados en el animal 3xTg-AD con el fin de evaluar su potencial fitoterapéutico.

# Capítulo 4. Objetivos

## 4.1 Objetivo general

Evaluar el potencial terapéutico de un extracto etanólico de *Nectandra reticulata* y el agonista sintético GW3965 en el modelo murino triple transgénico de la Enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD) y sus efectos sobre la taupatología.

## 4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar cambios cognitivos mediados por el extracto de *Nectandra reticulata* y GW3965 en el modelo 3xTg-AD.
2. Evaluar el efecto del extracto etanólico de *Nectandra reticulata* y GW3965 en el modelo 3xTg-AD sobre los marcadores histopatológicos A $\beta$ , Fosfo-Tau, APOE, Iba1 y GFAP.
3. Determinar el efecto del extracto etanólico de *Nectandra reticulata* y GW3965 sobre las fosforilaciones Ser202, Thr205, Ser231 de Tau y las quinasas CDK5 y GSK3 $\beta$ .

# Capítulo 5. Metodología

## 5.1 Modelo animal

Se utilizaron animales 3xTg-AD y PS1 Knock-in pertenecientes a las colonias del bioterio del SIU (Sede de Investigación Universitaria) de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia; se mantuvieron en cajas de entre 3 a 5 animales de acuerdo al diseño experimental (Tabla 1). Los animales fueron sometidos a ciclos de 12 horas luz/12 horas oscuridad y se les brindó agua y alimentación *ad libitum*. La formación de los grupos experimentales se llevó a cabo por selección aleatoria y proporcional de acuerdo a la disponibilidad del género.

Se realizó tratamiento oral mediante gavaje durante 12 semanas con el extracto de *Nectandra reticulata*, GW3965 y Vehículo (Vh) y se distribuyeron los animales en 4 grupos de la siguiente forma: **1. Tratamiento con *Nectandra reticulata***: se usaron 8 animales 3xTg-AD con una dosis de 25 mg/kg/día. **2. Tratamiento con GW3965**: se utilizaron 7 animales 3xTg-AD y 5 animales WT con una dosis de 33 mg/kg/día. **3. Controles con administración de Vehículo (Vh)**: se utilizaron 12 animales WT y 12 animales 3xTg-AD, el vehículo correspondía a propilenglicol (20%) y tween 20 (0,5%). Los animales PS1 Knock-In se consideraron animales de control o Wild Type (WT) (Tabla 5-1).

Tabla 5-1: Diseño experimental de tratamientos

WT	3xTg-AD			# total de animales
Vh	Vh	GW3965 (33 mg/kg)	<i>N. reticulata</i> 25 mg/kg)	
12	12	7	8	44

## 5.2 Laberinto acuático de Morris (MWM)

El aprendizaje y memoria espacial dependiente del hipocampo fue evaluada en el MWM (Morris R. G., 1982). El montaje de la prueba consiste en una piscina circular de color blanco de 100 cm de diámetro y 54 cm de alto, la cual es llenada con agua hasta una profundidad de 35 cm, el agua se mantiene a una temperatura de aproximadamente 22 °C ( $\pm 2$ ) y se

pigmenta con pintura blanca acuosa no toxica para opacarse. La plataforma de 10 cm de diámetro y 45 cm de alto es ubicada 1.5 cm por debajo de la altura del agua durante la prueba de aprendizaje y 1 cm por encima para el desarrollo de la prueba visible. El espacio es adecuado con señales visuales permanentes alrededor de la piscina (Morris R. G., 1982). Se realizaron 3 pruebas, que consistieron en: **1. Prueba de aprendizaje:** con el objetivo de evaluar la habilidad del roedor para aprender una tarea dependiente de la memoria espacial se realizaron dos ensayos diarios por 5 días consecutivos (una sesión de la mañana y otra en la tarde) con el fin de entrenar al roedor sobre la posición de la plataforma. Las sesiones diarias requirieron ubicar en una de los cuatro cuadrantes elegido pseudo-aleatoriamente al roedor, realizando previamente a la prueba inicial un ensayo de permanencia del animal en la plataforma durante 30 s. **2. Prueba de retención:** luego de 48 horas de la prueba de aprendizaje se realizó la prueba de retención en un ensayo único de 90 s en ausencia de la plataforma. En esta prueba se evaluó la latencia medida en tiempo de cada animal para llegar a la posición donde se encontraba la plataforma. **3. Prueba de plataforma visible:** Una vez terminada la prueba de retención se realizó una prueba con la plataforma visible para descartar diferencias físicas, como habilidades motoras, visuales o motivacionales entre los grupos. Todos los ensayos se analizaron con el complemento Animal Tracker del software Fiji. El análisis estadístico se realizó utilizando la aplicación Prim9.

### 5.3 Inmunofluorescencias

Finalizando las pruebas de comportamiento se llevó a cabo el sacrificio de los animales de acuerdo a las normas bioéticas colombianas (Ley 84 de 1989 y Resolución 8430 de 1993) e internacionales sobre bienestar animal, incluidas las pautas de Experimentos *In vivo* de Informes de Investigación Animal (ARRIVE) con anestesia (Xilacina 10mg/kg + Ketamina 90 mg/kg vía intraperitoneal). Una vez confirmado el estado de anestesia se realizó perfusión trans-cardial con 4% de p- formaldehido en buffer fosfato salino pH 7.4 (PBS). El tejido cerebral se retiró y fijó con paraformaldehido al 4% a 4 °C durante 48 horas. Los cerebros se preservaron bajo un gradiente creciente de sucrosa (10%, 20%, y 30%) a 4 °C, para ser cortados con un vibratomo (Vibrotome 1000 plus, Estados Unidos, California) en secciones coronales de 50  $\mu$ m, estas secciones se almacenaron a -20°C en medio de criopreservación.

Los cortes mantenidos en el medio de criopreservación se lavaron 3 veces con PBS. El tejido se permeabilizo durante una hora usando BSA 5%, SFB 10%, Triton X-100 0,1% en

TBS 1x. Se incubaron los cortes en anticuerpos en solución de anticuerpo primario por 36 horas a 4 °C en constante agitación, los anticuerpos primarios se encuentran descritos en la **tabla 5-2**. Posteriormente, se lavaron 3 veces con TTBS (Triton X-100 0,3%) y se incubaron 2 horas en anticuerpo secundario (**Tabla 5-3**). Posteriormente, los núcleos se tiñeron con DAPI 2:1000 (Santa Cruz Biotechnology, REF sc-3598). Luego los cortes se colocaron sobre laminas recubiertas con gelatina de porcino (Sigma Aldrich) y cubiertos con medio de montaje glicerol/gelatina.

**Tabla 5-2: Anticuerpo primarios para inmunofluorescencias**

Anticuerpo	Marca y referencia	Concentración	Especie hospedera
Amiloide beta	BioLegend (39320)	1:500	Ratón
<i>Lycopersicum esculentum</i>	DL1174	1:250	Tomate
Iba1	Abcam (Ab178847)	1:500	Conejo
p-Tau (AT8)	ThermoFisher (MN1020)	1:500	Ratón
Apoe	Abcam (Ab1907)	1:500	Ratón
GFAP	CellSignaling (E4L711)	1:500	Conejo

**Tabla 5-4: Anticuerpos secundarios para inmunofluorescencias**

Anticuerpo	Marca	Referencia	Concentración
Alexa Fluor 488 Antirabbit	ThermoFisher	A11008	1:1000
Alexa Fluor 568 Antimouse	ThermoFisher	A11004	1:1000

## 5.4 Análisis de microscopía confocal

Las micrografías se capturaron usando el microscopio confocal Nikon Eclipse C1 Plus (Nikon Instruments Inc. NY, USA). Se analizaron 2 secciones por ratón, 5 por grupo seleccionando cortes de la misma región ventro-dorsal. Los análisis de cuantificación de área de la fluorescencia del hipocampo (CA1, CA3, DG) y corteza (Corteza entorrinal y neocorteza) se realizaron en las imágenes tomadas con el objetivo 20x, su análisis se realizó con el software Image J. (<http://fiji.sc/wiki/index.php/Fiji>).

## 5.5 Western Blot

Tras realizar el ensayo comportamental MWM, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se recolectó el hipocampo. El material biológico se mantuvo en nitrógeno líquido a 80°C hasta su cuantificación. Los tejidos se homogenizaron utilizando un homegenizador (ProScientific PRO200) a alta velocidad durante 20 segundos en 300 µL de buffer RIPA (RIPA lysis buffer Santa Cruz Biotechnology REF. sc-24948), con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Thermo Scientific™ Pierce™ Phosphatase Inhibitor Mini Tablets). La mezcla se sonicoó en ultrasonido (QSonica CL-18) con amplitud de salida de 30% durante 10 segundos, para luego centrifugarse a 12.500 g a 4°C durante 15 minutos en microcentrífuga (Thermo Scientific™ Microcentrífuga Sorvall™ Legend™ Micro 17R, refrigerada). La cuantificación de proteína total del sobrenadante obtenido, se determinó usando el método de ácido bicinónico (BCA) (Thermo Scientific™ MicroBCA™ Protein Assay Kit) con patrones de referencia de BSA, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturante SDS-PAGE, usando 30 µg de proteína total de hipocampos a 100 V. Posteriormente a la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Amersham Hybond™-P; GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) en el equipo de transferencia (Trans-Blot Turbo Transfer system – BioRad) y se incubó en buffer de bloqueo (BSA al 5% en TBS-Tween 20) durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. La membrana de PVDF se incubó luego con 5 ml de anticuerpos primarios (**Tabla 5-4**) durante la noche a 4°C, seguidamente las membranas se lavaron 3 veces durante 5 min en TTBS. Posteriormente las membranas se incubaron en anticuerpo secundario (**Tabla 5-5**) conjugado con peroxidasa durante 2 horas a temperatura ambiente, finalizada la incubación se lavaron nuevamente 3 veces durante 5 min en TTBS. El anticuerpo unido se detectó usando el sistema ECL (Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU.).

**Tabla 5-5: Anticuerpos primarios para Western blot**

Anticuerpo	Marca y referencia	Concentración	Especie hospedera
p-Tau (AT8)	ThermoFisher (MN1020)	1:1000	Ratón
TAU 5	Abcam (Ab80579)	1:1000	Ratón
Cdk5	Santa Cruz (SC-173)	1:1000	Conejo
P35/25	Cell signaling (C64B10)	1:1000	Conejo
GSK3B	Sigma (PLA0232)	1:1000	Conejo
p-GSK3B	Abcam (Ab75745)	1:1000	Conejo
ApoE	Abcam (183596)	1:1000	Conejo
B-actina	Sigma-Aldrich (A3854)	1:1000	Conejo

**Tabla 6-5: Anticuerpos secundarios para Western blot**

Anticuerpo	Marca	Referencia	Concentración
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz	sc-2004	1:4000
Goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz	sc-2008	1:4000

## 5.6 Extracción de RNA de hipocampos

Para el análisis de expresión diferencial se seleccionaron 3 animales machos por grupo de forma aleatoria los cuales se sacrificaron mediante dislocación cervical, luego se extrajo el hipocampo. Una vez recolectado el tejido se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización para extracción de ARN total con el agente TRIzol (ambion, ref. 15596018) . En el momento de la extracción todos los materiales y superficies fueron lavadas y limpiadas con agua tratada con DEPC (UltraPure™ DEPC-Treated Water) para evitar la degradación del RNA (Simões, 2013). Se llevó a cabo el protocolo de extracción recomendado por el fabricante, donde los hipocampos se homogenizaron en 600  $\mu\text{L}$  de TRIzol usando homogeneizador (ProScientific PRO200), dado el alto contenido de grasa del tejido se centrifugo el lisado por 5 min a 12.000 g a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo para incubarse por 5 min, seguidamente se agregaron 120  $\mu\text{L}$  de Cloroformo para incubarse por 2 a 3 min, y continuar con la centrifugación por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Una vez terminada la centrifugación se obtuvo una



formación que contenía una fase acuosa (fase superior), una interfase y la fase orgánica (fase inferior). La fase acuosa que contenía el RNA, se transfirió cuidadosamente a un tubo nuevo, y se le agregaron 300  $\mu$ l de isopropanol para incubarse durante 10 min, esta mezcla se centrifugó por 15 min a 12.000 g a 4°C obteniendo así un precipitado blanco. Para lavar el RNA precipitado se resuspendió en 1 mL de etanol al 100% , y se centrifugó por 10 min a 12.000 g a 4 °C, este lavado se repitió una segunda vez. Una vez descartado el sobrenadante se dejó secar al aire el precipitado obtenido durante 5 min, para luego resuspender en 30  $\mu$ l agua libre de RNAsas. La total solubilización del RNA se logró luego de llevar a baño maría a 55 °C por 10 min (Invitrogen, 2016). El RNA total fue almacenado a -80°C.

## 5.7 Geles de agarosa para evaluación del RNA

La calidad de las muestras de RNA se evaluó en gel de agarosa usando la metodología de blanqueo. Los elementos usados como cámara de electroforesis horizontal y demás implementos se limpiaron con DEPC o hipoclorito para eliminar RNAsas. Se prepararon 50 mL de gel de agarosa (0,5 mg de agarosa en 50 mL de TBE 1x) en plancha de calentamiento a 150°C por 30 min. El gel se trató con 500  $\mu$ l de hipoclorito de sodio 6% y se dejó incubar por 5 - 10 min, luego de la incubación se adicionaron 3  $\mu$ l de bromuro de etidio. Las muestras se prepararon con buffer de carga y se dejaron correr en electroforesis a 80 V durante 60 min, y se reveló el gel en fotodocumentador.

## 5.8 RNA Seq

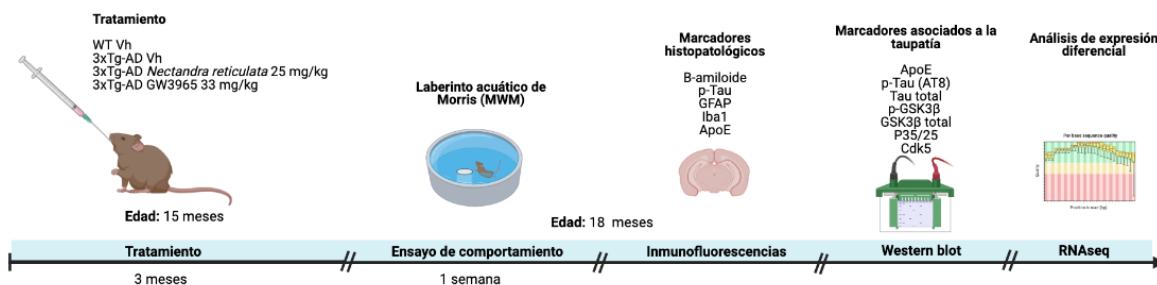
Los hipocampos de los ratones tratados con el extracto natural de *N. reticulata*, el agonista GW3965 y vehículo fueron homogenizados en el equipo ProScientific PRO200) y el RNA total fue aislado usando TRIzol® (Ambion-Life Technologies, ref. 5596018). La calidad del RNA fue evaluada usando el espectómetro™ NanoDrop 2000 y un gel de agarosa con hipoclorito de sodio (Bleach Gel)( Aranda 2012). Los hipocampos se precipitaron con etanol según la metodología de Walker & Lorsch (2013) y se almacenaron a -20 °C hasta su envío a MACROGEN para su secuenciación. Se confirmó el control de calidad de las muestras enviadas con RIN>7.0 y cantidad total >1.0  $\mu$ g. La librería utilizada fue TruSeq Stranded Mrna y el secuenciamiento se realizó en el equipo Illumina NovaSeq6000

utilizando un enfoque paired-ended 100 pb a una profundidad de secuenciación promedio de 40 millones de lecturas por muestra.

El análisis bioinformático RNA-seq se realizó siguiendo la *pipeline* sugerida por Battaglia (2017). El análisis de expresión génica diferencial se realizó utilizando el paquete de R DESeq2 (Bioconductor). Los niveles de expresión génica se compararon entre los vehículos 3xTg-AD y los ratones tratados con el extracto de *N. reticulata* y GW3965 para identificar los genes expresados diferencialmente (DEGs). Entre los DEGs, se seleccionaron aquellos que tenían una diferencia del valor absoluto de log2FoldChange >0,6 y un valor p <0,05 en comparación con el vehículo. Además, estos DEGs se utilizaron para el análisis de enriquecimiento funcional utilizando la herramienta de anotación *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID)(Huang et al., 2009).

**Figura 5-1 Imagen representativa de la metodología.**

Grupos experimentales WT Vh (n=8), 3xTg-AD Vh (n=12), 3xTg-AD *Nectandra reticulata* (n=8) y 3xTg-AD GW3965 (n=7), con duración de tratamiento por 3 meses a animales de 15 meses de edad. Ensayo de comportamiento con el paradigma del Laberinto acuático de Morris (MWM) con duración de 1 semana, seguido del sacrificio por perfusión trans-cardial con 4% de p-formaldehído, cortes de secciones coronales de 50 µm y tinción de anticuerpo primarios dirigidos a marcadores histopatológicos y marcadores relacionados con la taupatía. Western blot de proteínas relacionadas con la taupatía y extracción de RNA total para análisis de expresión diferencial utilizando RNAseq. Vh=Vehículo, WT= Wyld type , 3xTg- AD= Animal triple transgénico EA.



## Capítulo 6. Resultados: Tratamiento con el extracto de *Nectandra reticulata*

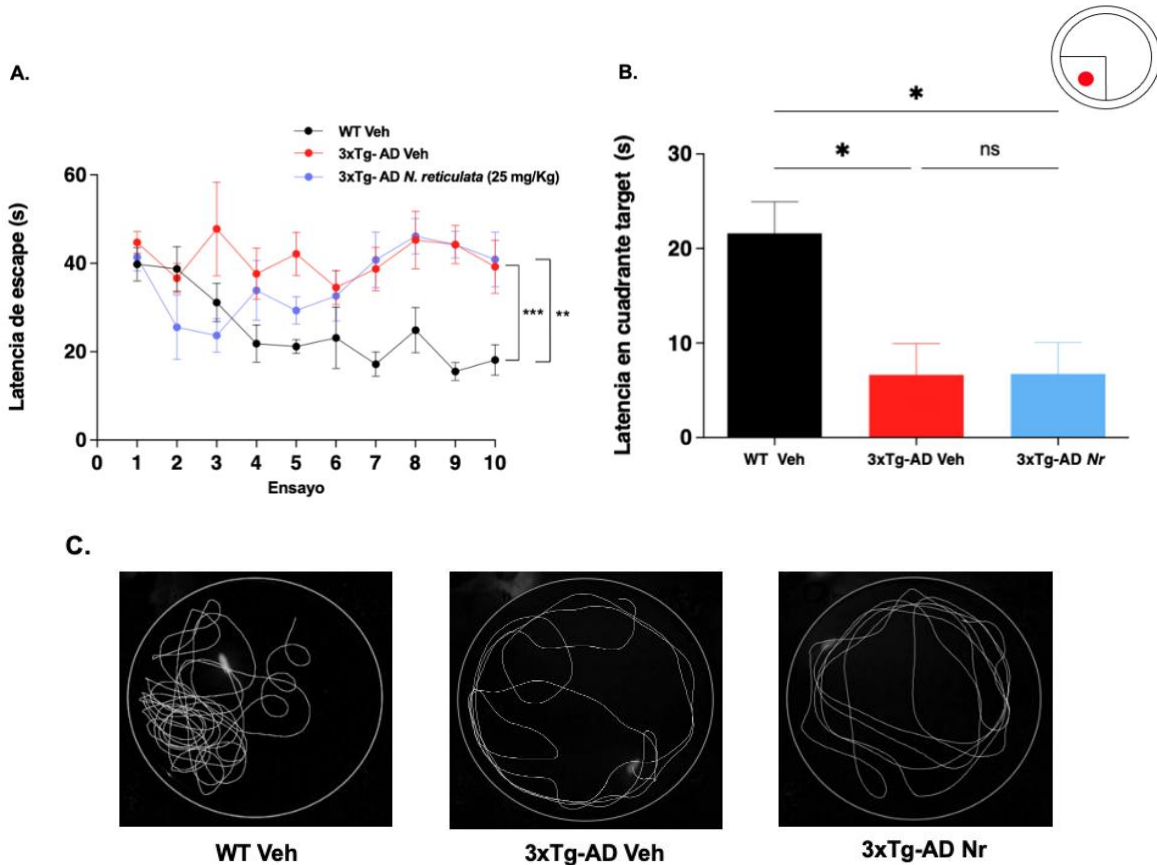
### 6.1 El tratamiento con *N. reticulata* modificó levemente las estrategias de aprendizaje

Se evaluó el efecto de una dosis de 25 mg/kg/día del extracto de *N. reticulata* en la cognición usando el Laberinto Acuático de Morris. En la prueba de aprendizaje se observó que los animales WT tratados con el vehículo (Veh) mostraron una reducción de latencias de llegada a la plataforma a lo largo de la prueba, por su parte los animales 3xTg-AD tratados con el vehículo (Veh) que en adelante los llamaremos 3xTg-AD(Veh) no redujeron los tiempos de latencia de escape, manteniendo tiempos aproximados a los 40 segundos durante los 5 días de aprendizaje. Se observó que los animales 3xTg-AD(Veh) presentaron tiempos de latencia significativamente mayores respecto a los animales WT(Veh) ( $P < 0.001$ ) (**Figura 6-1A**). En el caso de los animales 3xTg-AD tratados con *N. reticulata* que en adelante los llamaremos 3xTg-AD(Nr), presentaron una reducción en latencia de escape a la plataforma durante los primeros cuatro ensayos, similar a los animales WT(Veh), sin embargo, estos tiempos aumentaron desde el ensayo 5 hasta el 10, evidenciando tiempos de latencia similares a los de animales 3xTg-AD(Veh), sin observar diferencias estadísticas significativas entre los grupos 3xTg-AD(Veh) y 3xTg-AD(Nr).

Durante la prueba de retención realizada 48 horas finalizada la prueba de aprendizaje (**Figura 6-1B**), se evidenció que los animales WT(Veh) permanecieron un tiempo significativamente mayor en las cercanías de la plataforma con respecto a los animales 3xTg-AD(Veh) y 3xTg-AD(Nr) ( $P > 0.05$ ), sin observar cambios entre los grupos 3xTg-AD(Veh) y 3xTg-AD(Nr) indicando que no hay un proceso de consolidación de la memoria espacial en animales 3xTg-AD(Nr) a la dosis de 25 mg/kg/día.

**Figura 6-1: Efecto del extracto de *N. reticulata* en la memoria espacial evaluada por MWM después de 3 meses de tratamiento (A) Análisis de tiempos de latencia de llegada**

a la plataforma. **(B)** Prueba de retención, tiempo de permanencia en cuadrante target. **(C)** Recorridos representativos de la prueba de retención. Todos los datos fueron expresados como la media  $\pm$  S.E.M. \*\*\* representa  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ , \* representa  $P < 0.05$  comparado con WT(Veh).

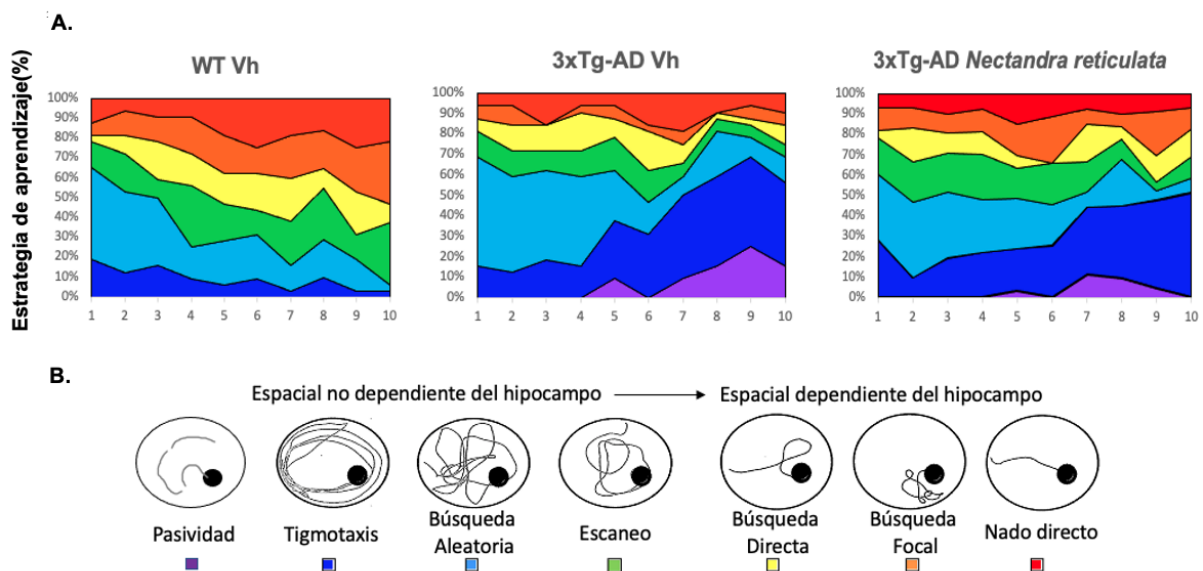


Dicho comportamiento es confirmado al analizar las trayectorias, donde se observó que tanto los animales 3xTg-AD(Veh) y 3xTg-AD(Nr) preferían la periferia de la piscina denominado tigmotaxico y sin evidencia de persistencia en la exploración en el perímetro de la plataforma (**Figura 6-1C**).

Teniendo en cuenta que los resultados de la prueba de aprendizaje no fueron los esperados y con el fin de caracterizar el comportamiento observado durante esta prueba, se realizó un análisis de las estrategias de navegación espacial dependientes y no dependientes del hipocampo según Van der Jeugd y colaboradores (2018). Para realizar un análisis más detallado de acuerdo con las observaciones durante la prueba, se decidió incluir un séptimo comportamiento que se denominó “pasividad” o flotación (color verde en la **Figura 6-2B**)

que se caracteriza por un patrón de flotación de los animales durante los primeros segundos del intento, seguido por un nado y que finaliza nuevamente con flotación (Grauer, E. 1993).

**Figura 6-2: Efecto del extracto de *N. reticulata* en las estrategias de navegación espacial de ratones en el MWM. (A) Efecto de los tratamientos sobre las estrategias de aprendizaje de los diferentes grupos experimentales. (B) Representación esquemática de las estrategias utilizadas en la prueba de comportamiento del laberinto acuático de Morris.**



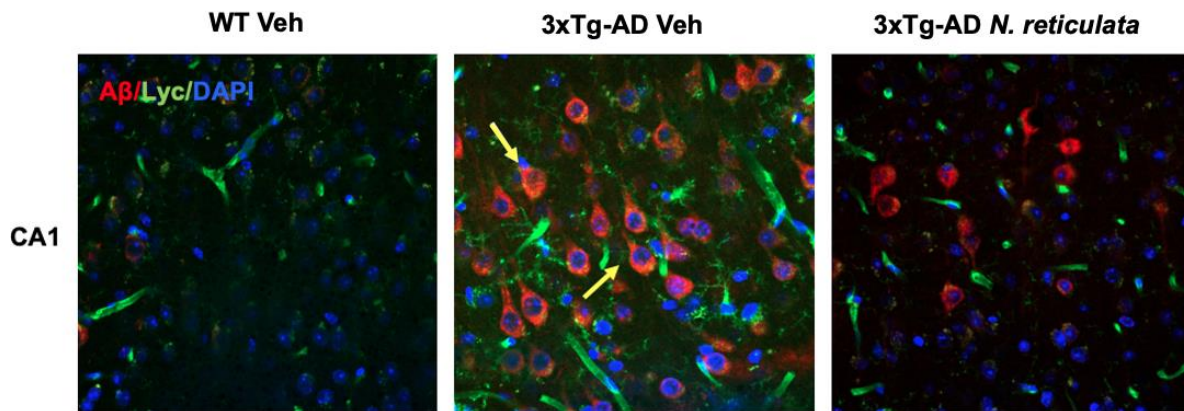
Se observó que los animales WT(Veh) presentan una progresión en el uso de estrategias de aprendizaje dependientes del hipocampo que incrementaron en frecuencia con el número de ensayos o días de la prueba. En el caso de los animales 3xTg-AD(Veh) y 3xTg-AD(Nr) predominaron las estrategias espaciales no dependientes del hipocampo, evidenciando que no hay un proceso de aprendizaje. Adicionalmente, se observó que los animales 3xTg-AD(Nr) en los primeros días de la prueba presentaron un incremento del 10% de uso de estrategias dependientes del hipocampo, porcentaje que se reduce e iguala al de los animales 3xTg-AD(Veh) en el transcurso de la prueba (**Figura 6-2A**).

## 6.2 El tratamiento con *N. reticulata* no modificó la carga amiloide cerebral en los animales envejecidos

Con el propósito de evaluar el efecto del extracto de *Nectandra reticulata* sobre la carga amiloide y Tau, se realizó inmunofluorescencia con anticuerpos dirigidos para A $\beta$  (6E10) a

través de micrografías tomadas a una magnificación de 60X en el área de CA1 del hipocampo. El antígeno 6E10 reconoce los residuos 3 al 8 del péptido. Se observó en animales 3xTg-AD(Veh) la presencia del péptido A $\beta$  intracelular (flecha amarilla). En contraste, los animales WT(Veh) no presentaron inmunoreactividad para este marcador, lo que evidencia la presencia de una patología amiloide instaurada en el hipocampo de animales 3xTg-AD, coincidiendo con el desarrollo de la patología en el modelo (Oddo, S., 2003) (**Figura 6-3**).

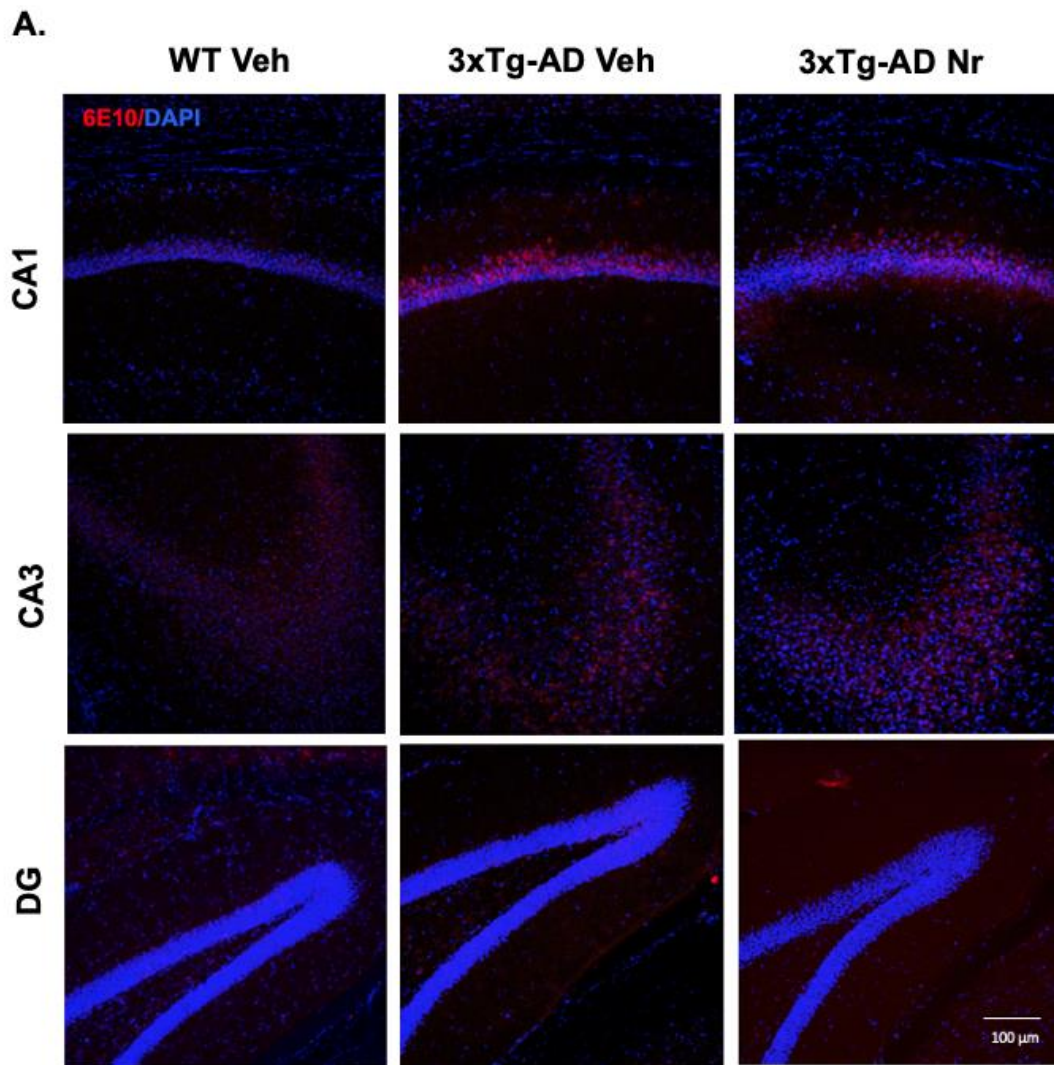
**Figura 6-3: Micrografías representativas de CA1.** Magnificación de 60x para 6E10 (rojo), núcleos con DAPI (Azul).  $\beta$ -amiloide intracelular (flecha amarilla).



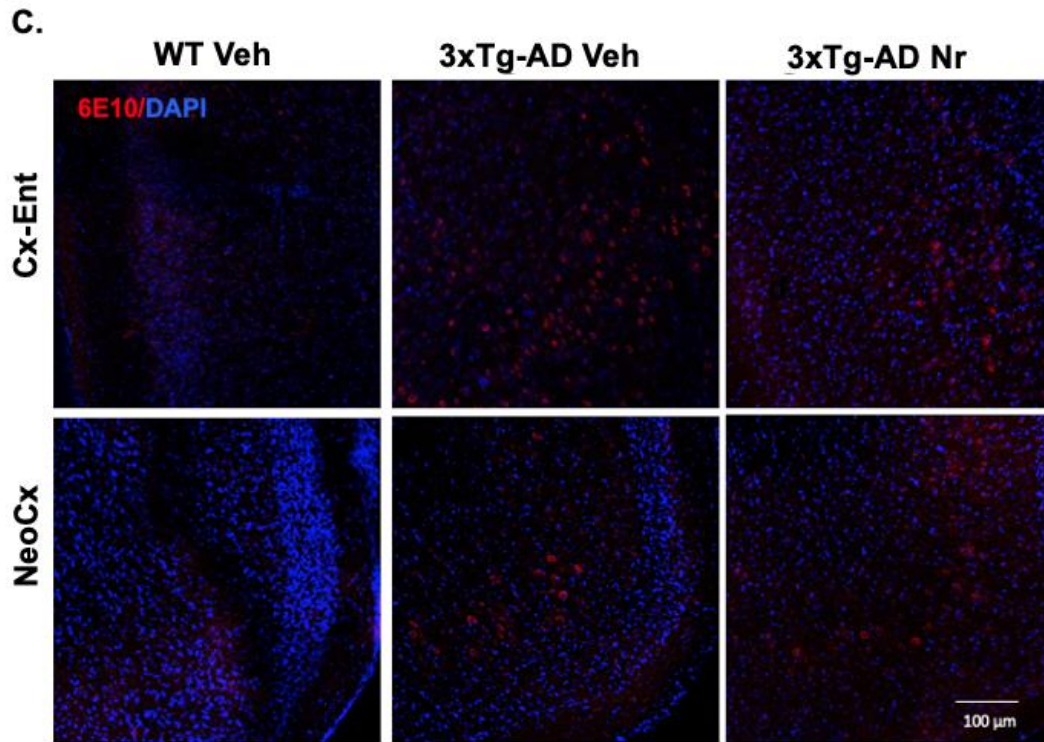
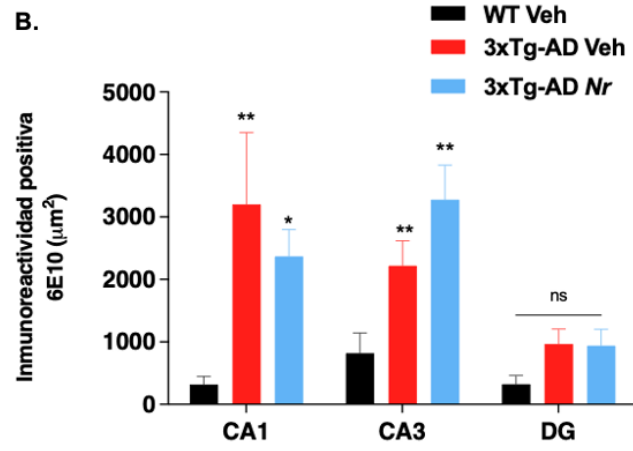
Con el propósito de comprender los resultados en el desempeño durante la prueba de aprendizaje y su relación neuropatológica, se analizó la inmunoreactividad +6E10 en el hipocampo y la corteza cerebral (**Figura 6-4**). Se observó un aumento estadísticamente significativo ( $P < 0.01$ ) del área inmunorreactiva en animales 3xTg-AD(Veh) en comparación con los animales WT(Veh) de la inmunoreactividad del antígeno 6E10. En el caso de los animales 3xTg-AD(Nr), al igual que los animales 3xTg-AD(Veh) se presentó un aumento significativo del marcador en comparación con los animales WT(Veh) ( $P < 0.01$ ), sin evidenciar una reducción significativa de la carga amiloide en el hipocampo y corteza tras el tratamiento (**Figura 6-4B,D**).

**Figura 6-4: El tratamiento con el extracto de *N. reticulata* no modifica la carga amiloide tras el tratamiento.** (A) Micrografías representativas de las regiones de cortes de hipocampo específicamente CA1, CA3 y DG para la inmunoreactividad para 6E10 (rojo), núcleos teñidos con DAPI (Azul). (B) Cuantificación del área positiva para 6E10 en las regiones CA1, CA3 y DG del hipocampo. (C) Micrografías representativas de las regiones

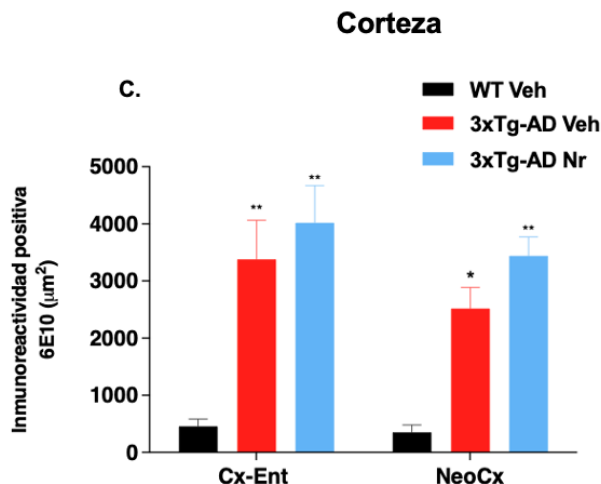
de cortes de la cortezas Cx-Ent y NeoCx para la inmunoreactividad para 6E10. **(D)** Cuantificación del área de inmunoreactividad para 6E10 en las regiones Cx-Ent y NeoCx. Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  S.E.M. Los análisis estadísticos fueron realizados por ANOVA de dos vías seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. \* representa  $P < 0.05$ , \*\* representa  $P < 0.01$  comparado con WT(Veh).



## Hipocampo







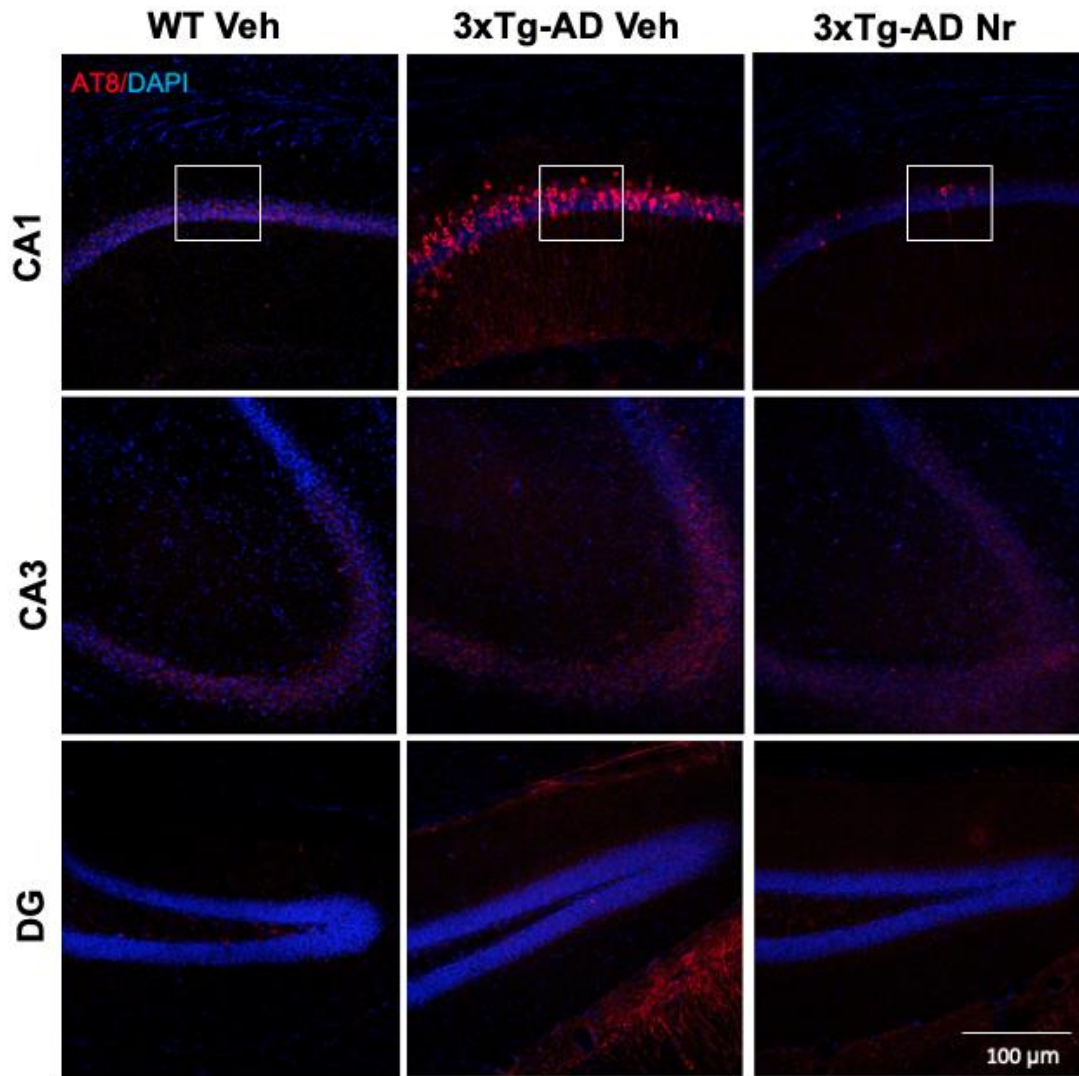
### 6.3 El extracto de *N. reticulata* modifica los niveles de fosforilación de Tau en los animales 3xTg- AD.

Respecto a la patología Tau, se observó que los animales 3xTg-AD(Veh) presentaron mayores niveles de inmunoreactividad para el marcador AT8 en comparación con animales WT(Veh) en las regiones analizadas de hipocampo y la corteza cerebral ( $p < 0.05$  –  $p < 0.0001$ ), marcación característica del desarrollo de la patología del modelo murino (**Figura 6-5**). Los animales WT(Veh) no presentan la mutación *MAPT* P301L, por lo cual no presentan marcaje para el anticuerpo. Los animales 3xTg-AD(Nr) presentaron una reducción estadísticamente significativa de la inmunoreactividad para este marcador (**Figura 6-5A-C**). El efecto de la reducción del marcador se observó en las regiones CA1 y DG del hipocampo ( $P < 0.0001$  y  $P < 0.01$  respectivamente). No se observaron diferencias significativas en el hipocampo entre los grupos 3xTg-AD(Veh) y 3xTg-AD(Nr) (**Figura 6-5C,D**).

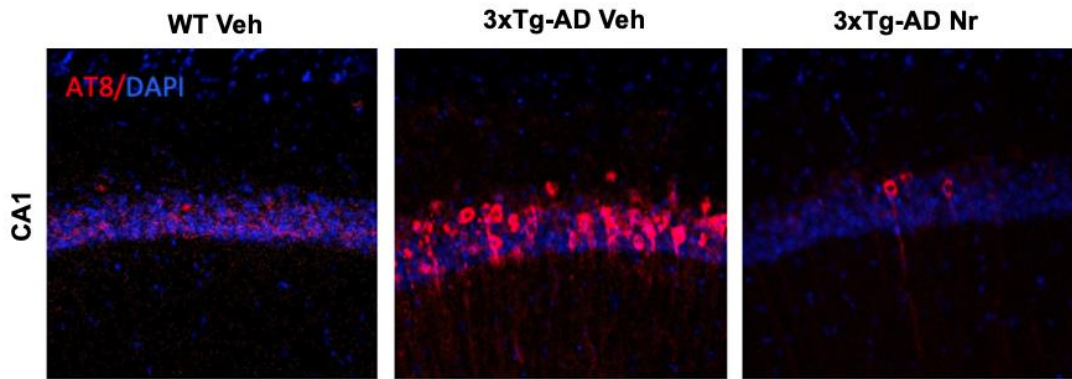
**Figura 6-5: El tratamiento con el extracto de *N. reticulata* reduce la fosforilación Tau marcada con el anticuerpo AT8 en animales 3xTg-AD. (A)** Micrografías representativas de las regiones de cortes de hipocampo específicamente CA1, CA3 y DG para la inmunoreactividad para AT8 (rojo), núcleos fueron marcados con DAPI (Azul). **(B)** Ampliación de la región CA1 del hipocampo. **(C)** Cuantificación del área de la inmunoreactividad +AT8. **(D)** Micrografías representativas de Cx-Ent y NeoCx para inmunoreactividad para AT8. **(E)** Cuantificación de la área +AT8 en las regiones Cx-Ent y

NeoCx. Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  S.E.M. Los análisis estadísticos fueron realizados por ANOVA de dos vías seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. \*\*\*\* representa  $P < 0.0001$ , \*\*\* representa  $P < 0.001$ , \*\* representa  $P < 0.01$ , \* representa  $P < 0.05$  comparado con WT(Veh). ##### representa  $P < 0.0001$ , ## representa  $P < 0.01$  comparados con 3xTg-AD(Veh).

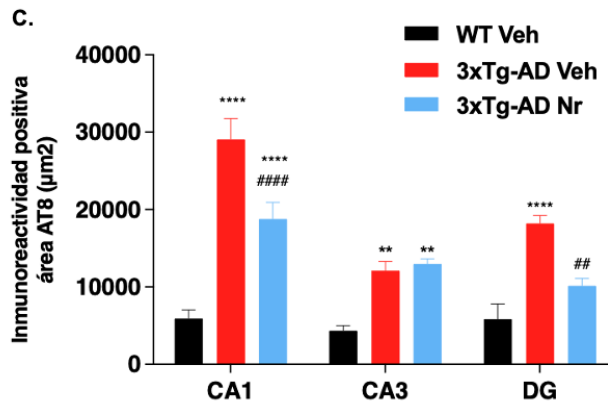
**A.**

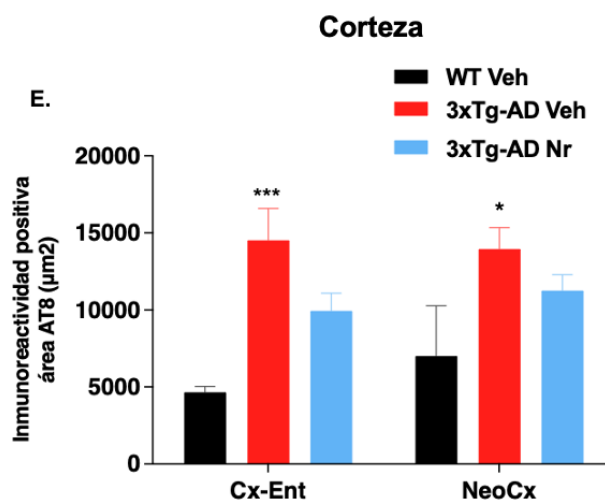
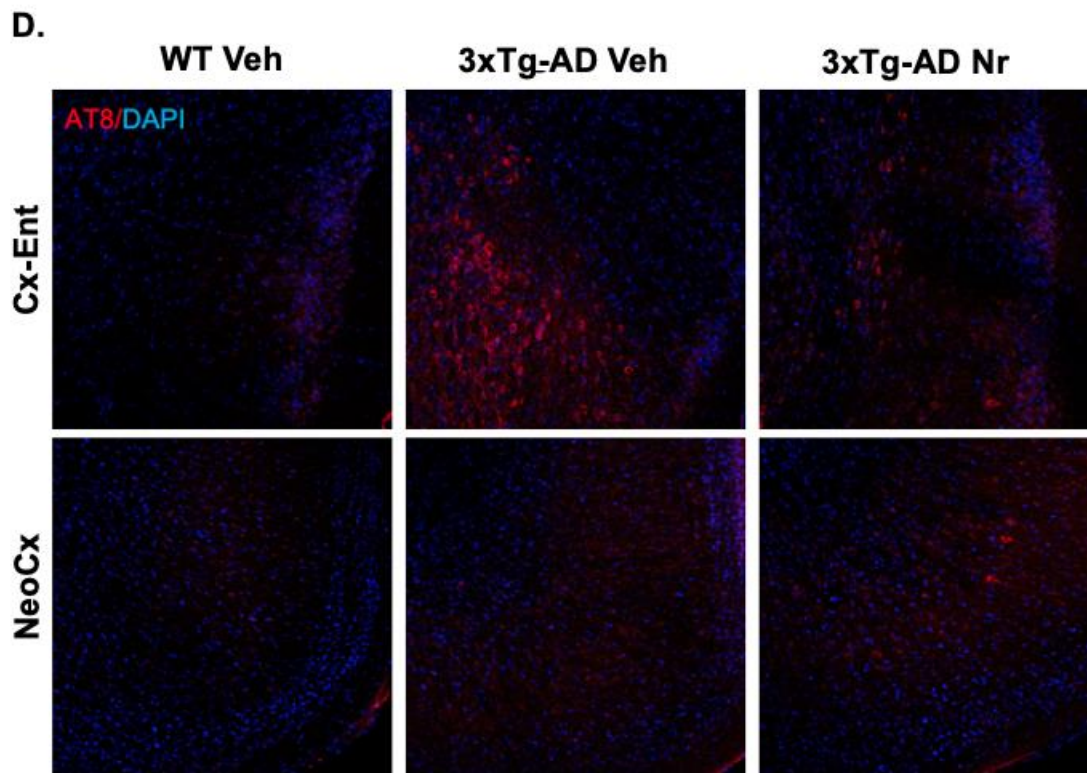


B.



Hipocampo

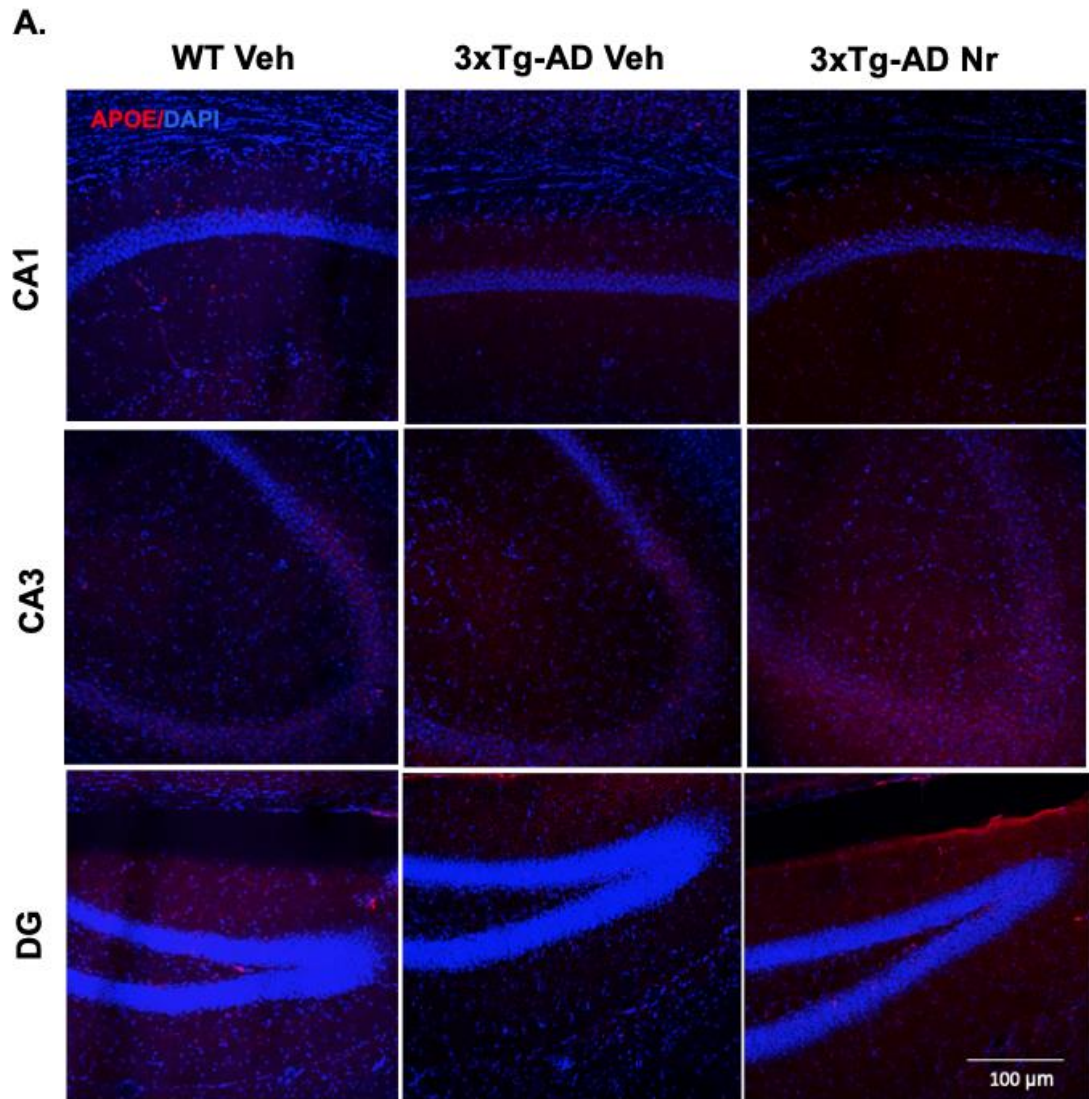




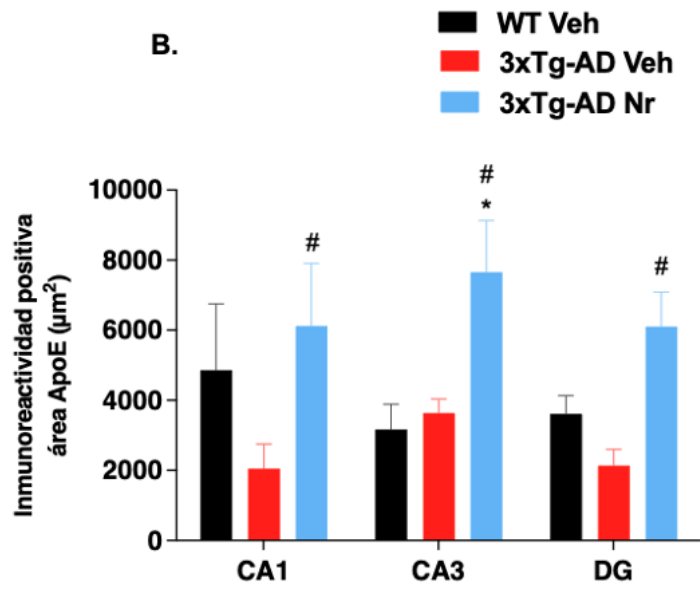
## 6.4 El extracto de *Nectandra reticulata* aumenta los niveles de ApoE en el hipocampo.

Considerando la actividad LXR del extracto etanólico de *N. reticulata* descrita previamente, se evaluó la expresión de ApoE mediante inmunofluorescencia (**Figura 6-6**), y por Western-blot (**Figura 6-7**). Se observó un incremento de la inmunoreactividad positiva de ApoE en animales 3xTg-AD(Nr) respecto a los animales WT(Veh) en CA3 del hipocampo ( $P < 0.05$ ) (**Figura 6-6A,B**). Los animales 3xTg-AD(Nr) presentaron un incremento estadísticamente significativo en las 3 regiones del hipocampo respecto a los animales 3xTg-AD(Veh) ( $P < 0.05$ ) (**Figura 6-6A,B**). No se observaron cambios significativos en la expresión de ApoE en la corteza cerebral (**Figura 6-6C,D**). Se observó un incremento de los niveles de expresión de aproximado de 4 veces en el hipocampo, en animales 3xTg-AD(Nr) en comparación con los animales 3xTg-AD(Veh) ( $P < 0.05$ ) (**Figura 6-7**). No se observaron cambios estadísticamente significativos entre los animales WT(Veh) y 3xTg-AD(Veh).

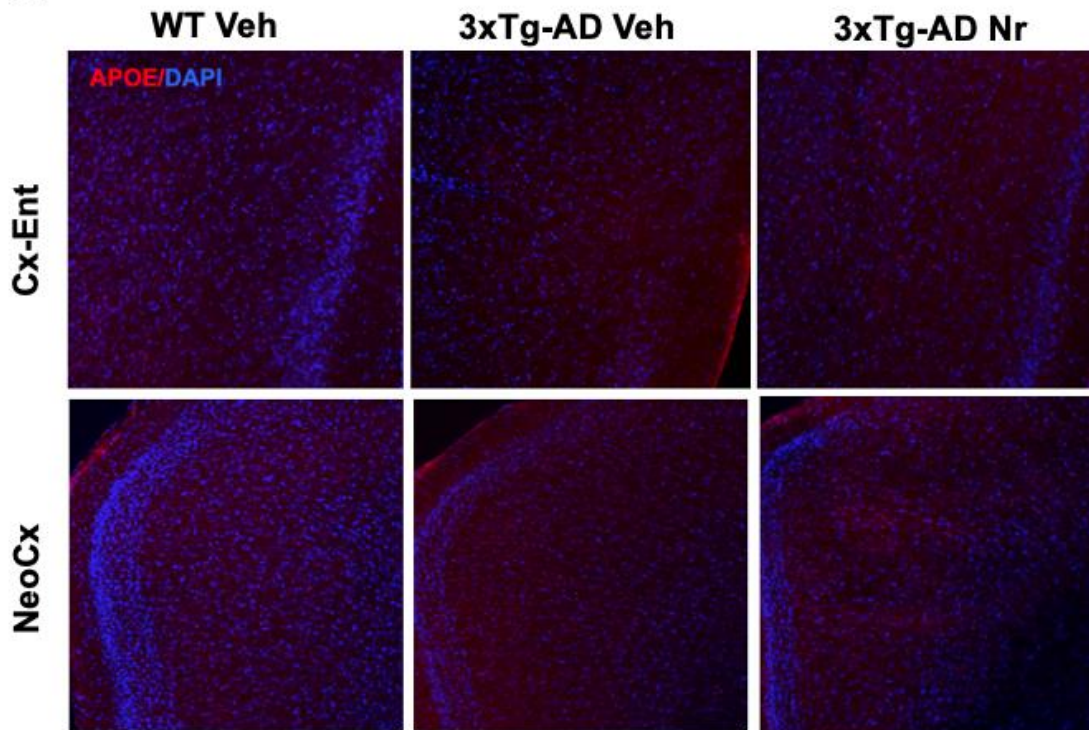
**Figura 6-6: El tratamiento con el extracto de *N. reticulata* incrementó la expresión de ApoE en modelo 3xTg-AD. (A)** Micrografías representativas de las regiones de cortes de hipocampo específicamente CA1, CA3 y DG del hipocampo para la inmunoreactividad para ApoE (rojo), los núcleos fueron teñidos con DAPI (Azul). **(B)** Cuantificación del área +ApoE en las regiones CA1, CA3 y DG del hipocampo. **(C)** Micrografías representativas de las regiones de la corteza específicamente Cx-Ent y NeoCx para la inmunoreactividad +ApoE. **(D)** Cuantificación del área +ApoE en la Cx-Ent y NeoCx. Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  S.E.M. Los análisis estadísticos fueron realizados por ANOVA de dos vías seguido de un test de comparaciones múltiples de Bonferroni. \* representa  $P < 0.05$  comparado con WT(Veh). # representa  $P < 0.05$  comparados con 3xTg-AD(Veh).

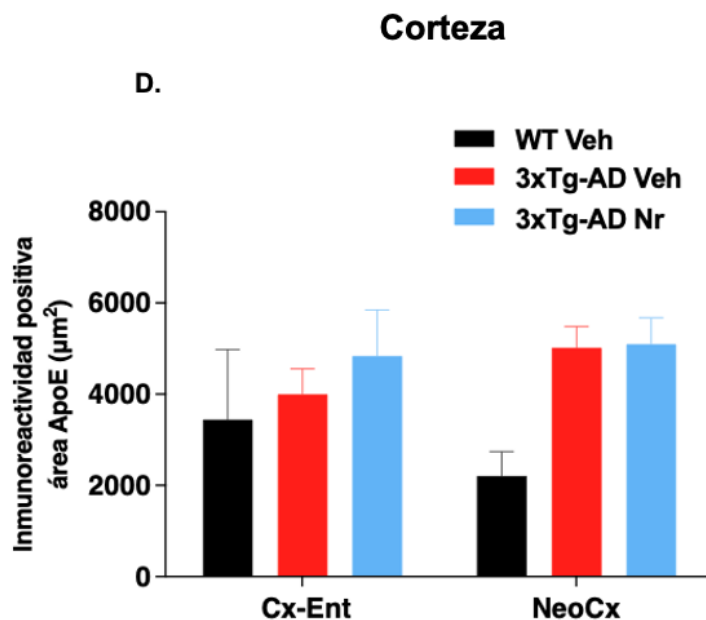


## Hipocampo



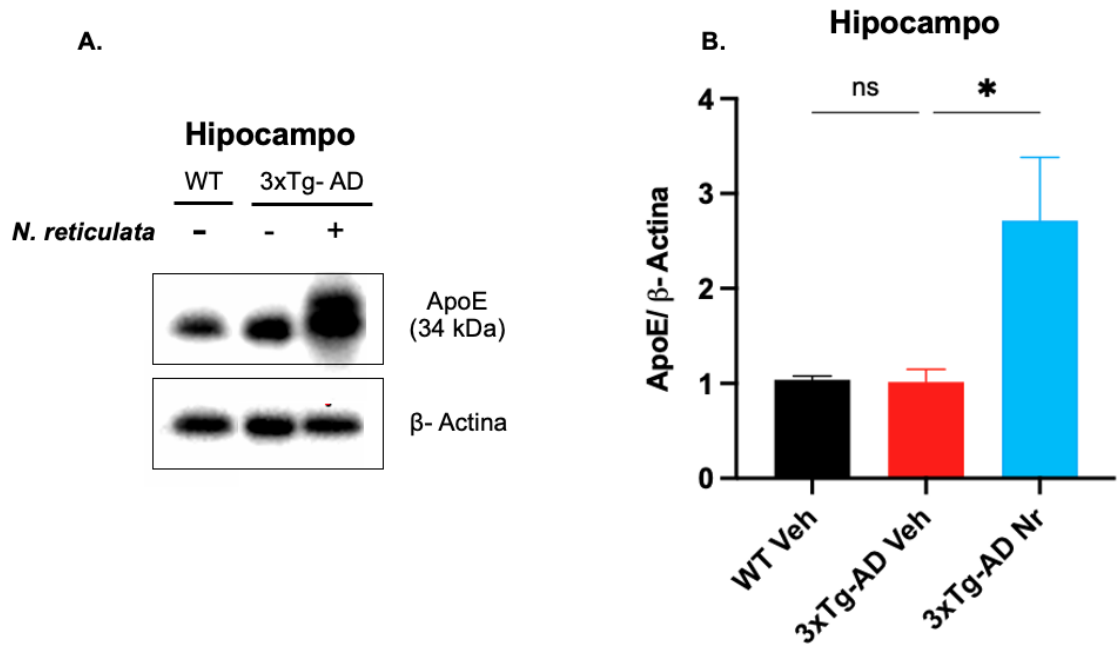
C.





**Figura 6-7: El extracto de *N. reticulata* incrementa los niveles de proteína ApoE en el hipocampo en modelo 3xTg-AD. (A)** Imágenes representativas de WB de ApoE y  $\beta$ -actina de hipocampo de animales WT(Veh), 3xTg-AD(Veh) y 3xTg-AD(Nr). **(B)** Cuantificación de la densitometría de los ensayos de WB de ApoE en lisados de cerebro de hipocampo de animales WT(Veh), 3xTg-AD(Veh) y 3xTg-AD *N. reticulata*. Las muestras de cada animal fueron normalizadas contra la respuesta de  $\beta$ -actina y expresadas como la tasa de cambio (fold change). Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  S.E.M. Los análisis estadísticos fueron realizados por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. # representa  $P < 0.05$  comparado con animales 3xTg-AD(Veh).





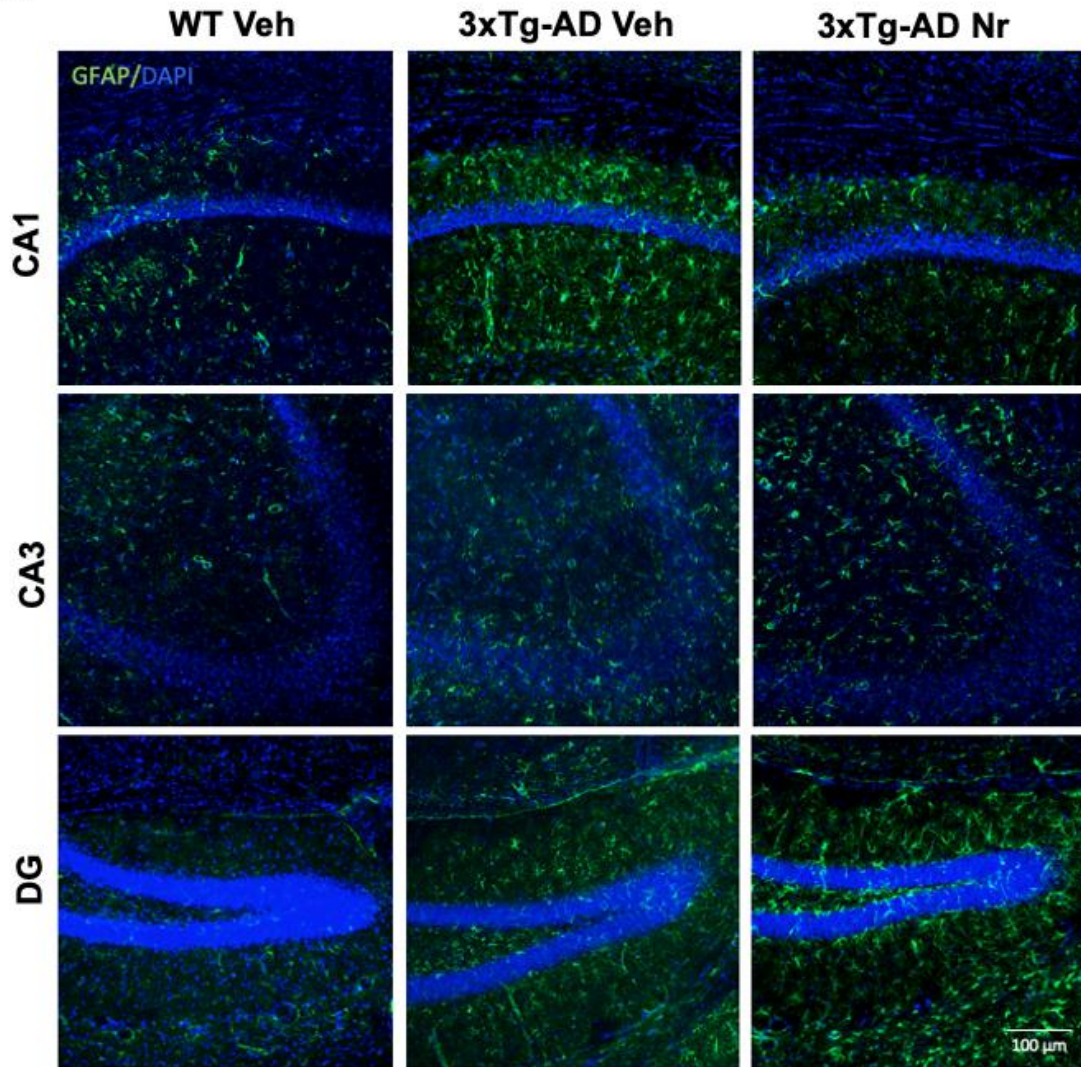
## 6.5 El extracto de *N. reticulata* reduce la astrogliosis en el hipocampo del animal 3xTg-AD.

Las células responsables de expresar predominantemente ApoE son los astrocitos, sin embargo, la astrogliosis también es un marcador de respuesta al daño en el SNC mediante la formación de la astrogliosis. Se evaluó la respuesta de inmunoreactividad de la proteína acida fibrilar glial (GFAP) como un marcador de astrocitos. Se observó que los animales 3xTg-AD(Veh) presentan un incremento estadísticamente significativo en las regiones CA1 ( $P < 0.001$ ), CA3 ( $P < 0.01$ ) y DG ( $P < 0.001$ ) del hipocampo en comparación con los animales WT(Veh) (**Figura 6-8<sup>a</sup>,B**). Fenotipo descrito previamente en el modelo (Oddo et al. 2003). Adicionalmente, se evidenció que el tratamiento con el extracto de *N. reticulata* produce reducción del área inmunoreactiva +GFAP en los animales 3xTg-AD en comparación con los controles WT(Veh) en CA1 ( $P < 0.01$ ), y en CA3 ( $P < 0.05$ ), pero no en el DG (**Figura 6-8A,B**). No se observaron cambios estadísticamente significativos en las regiones de las cortezas (**Figura 6-8C,D**).

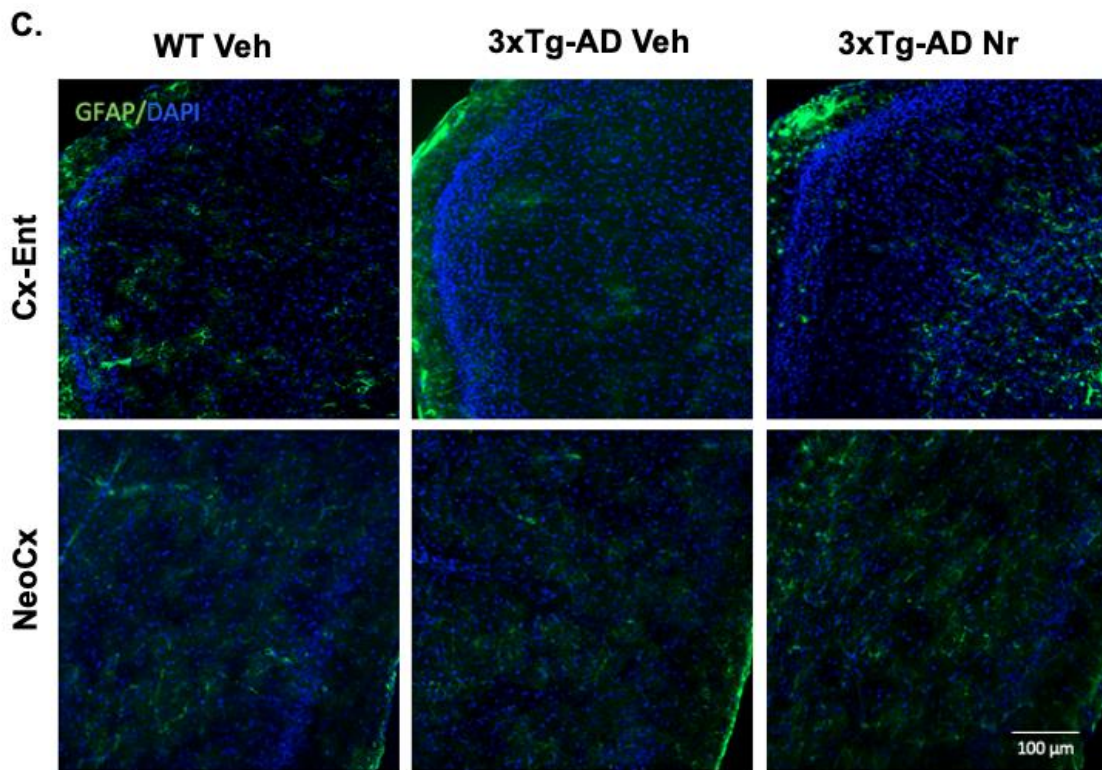
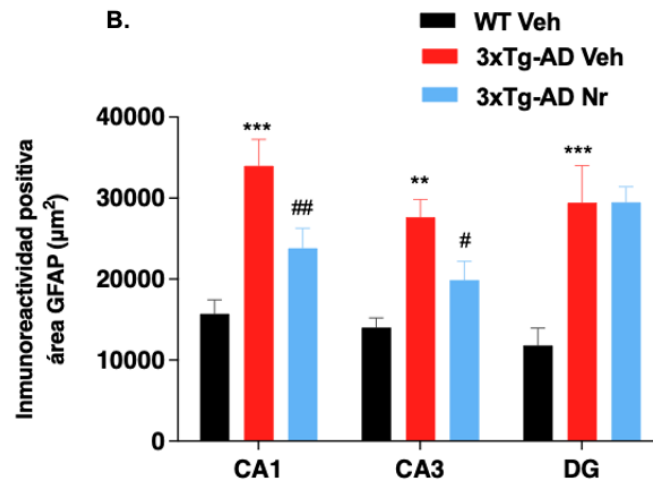
**Figura 6-8: El tratamiento con el extracto de *N. reticulata* reduce la astrogliosis en CA1 y CA3 en ratones 3xTg-AD.** (A) Micrografías representativas de las regiones CA1, CA3 y DG del hipocampo. GFAP (verde), núcleos teñidos con DAPI (Azul). (B) Cuantificación del área + GFAP en las regiones CA1, CA3 y DG del hipocampo. (C)

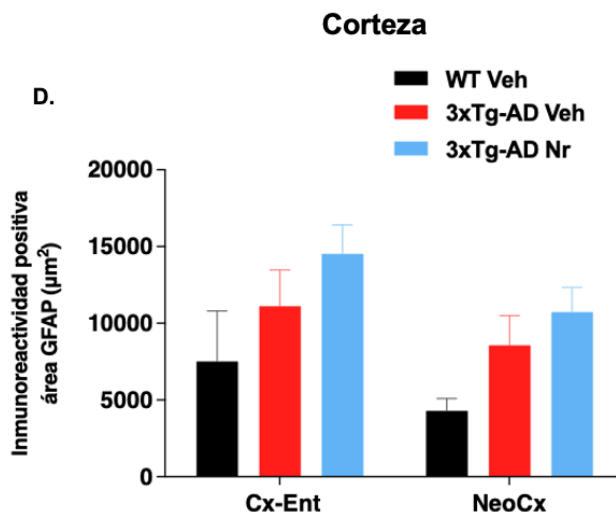
Micrografías representativas de las regiones Cx-Ent y NeoCx para la inmunoreactividad para +GFAP. **(D)** Cuantificación del área + GFAP en las regiones Cx-Ent y NeoCx. Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  S.E.M. Los análisis estadísticos fueron realizados por ANOVA de dos vías seguido de un test de comparaciones múltiples de Bonferroni. \*\*\* representa  $P < 0.001$ , \*\* representa  $P < 0.05$  comparado con WT(Veh). # representa  $P < 0.05$ , ## representa  $P < 0.01$  comparados con 3xTg-AD(Veh).

**A.**



## Hipocampo

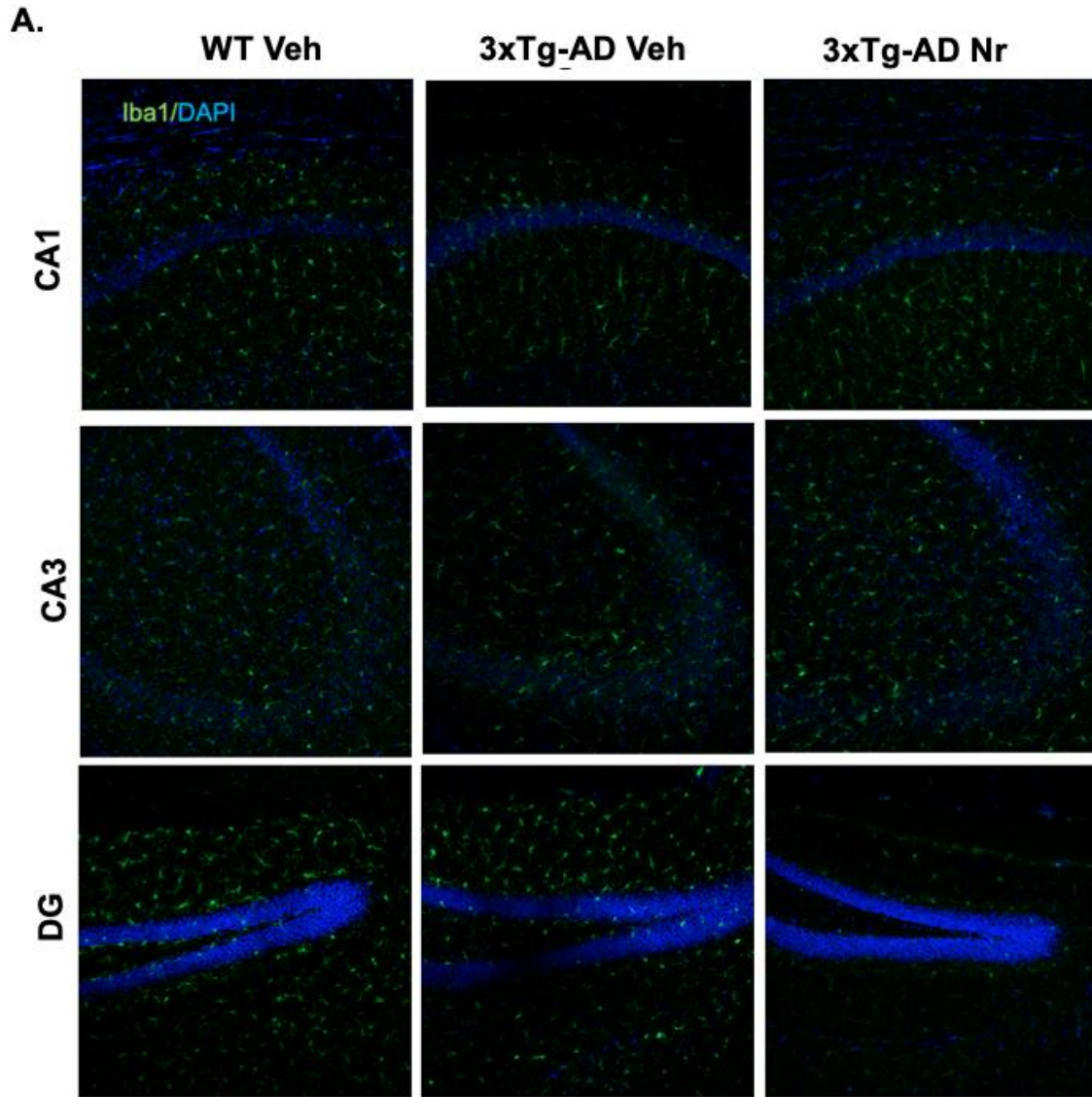




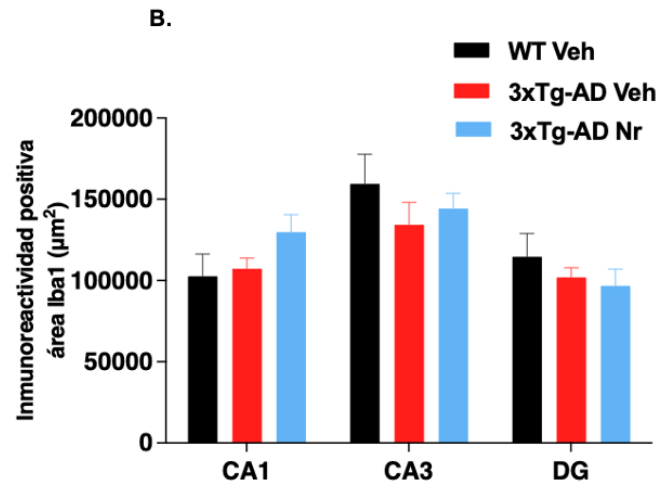
## 6.6 El extracto de *N. reticulata* no induce cambios evidenciados en Iba1 y vasos sanguíneos (*Lycopersicon esculentum*).

El proceso inflamatorio es un aspecto patológico asociado a la EA. De acuerdo con esto se usó el marcador de microglia reactiva Iba1. No se detectaron diferencias significativas en la inmunoreactividad + Iba 1 entre los grupos experimentales en las regiones de hipocampo y corteza evaluadas (Figura 6-9).

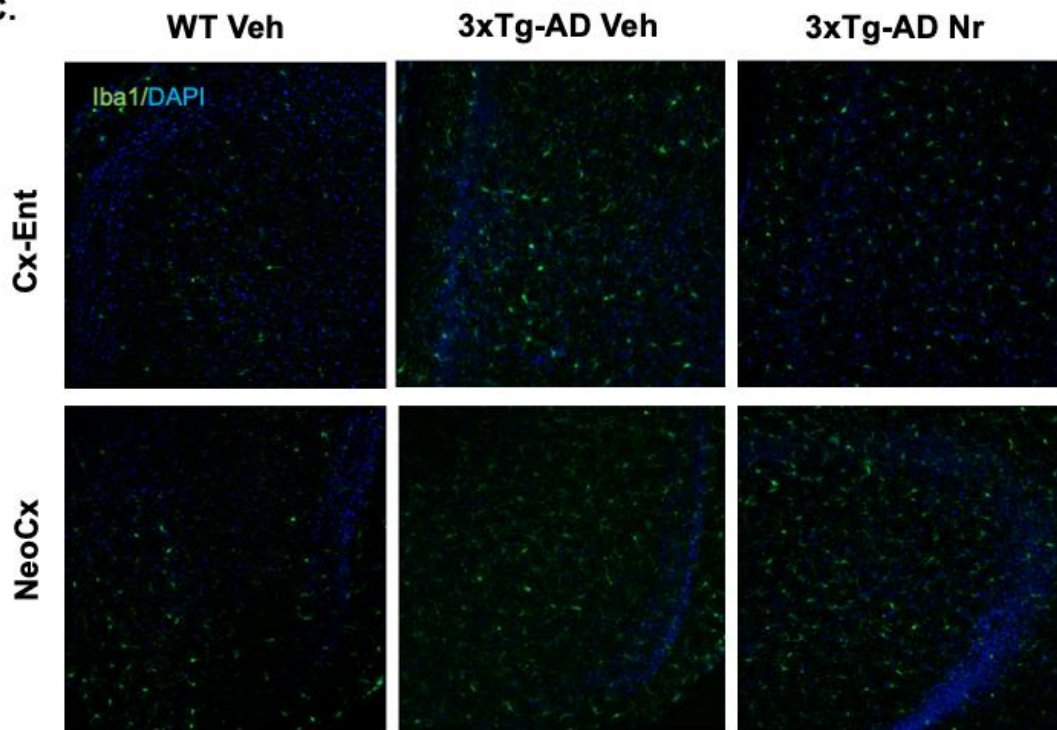
**Figura 6-9: El tratamiento con *N. reticulata* no modifica la activación microglial en los animales 3xTg-AD. (A)** Micrografías representativas de las regiones de cortes de hipocampo específicamente CA1, CA3 y DG para la inmunoreactividad para Iba1 (verde) que tiñe microglia reactiva, los núcleos fueron teñidos con DAPI (Azul). **(B)** Cuantificación del área positiva para Iba1 en las regiones del hipocampo (CA1, CA3 y DG). **(C)** Micrografías representativas de las regiones de cortes de la cortezas Cx-Ent y NeoCx para la inmunoreactividad para Iba1. **(D)** Cuantificación de la área positiva para Iba1 en las regiones de la corteza (Cx-Ent y NeoCx). Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  S.E.M. Los análisis estadísticos fueron realizados por ANOVA de dos vías seguido de un test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

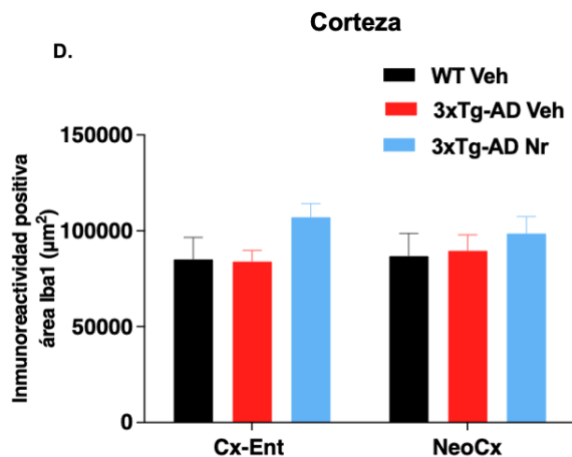


## Hipocampo



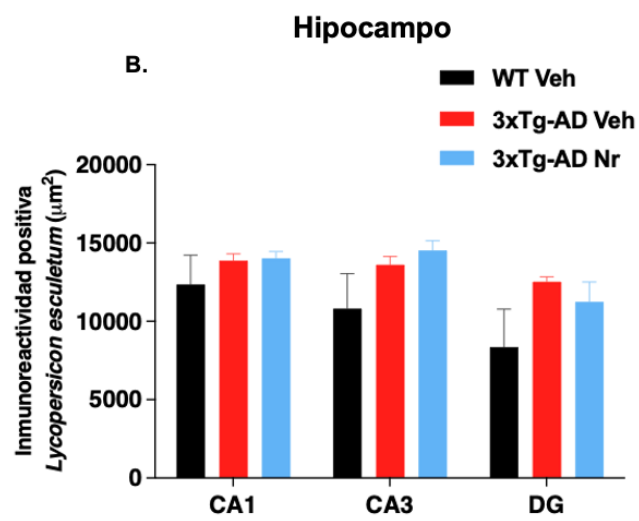
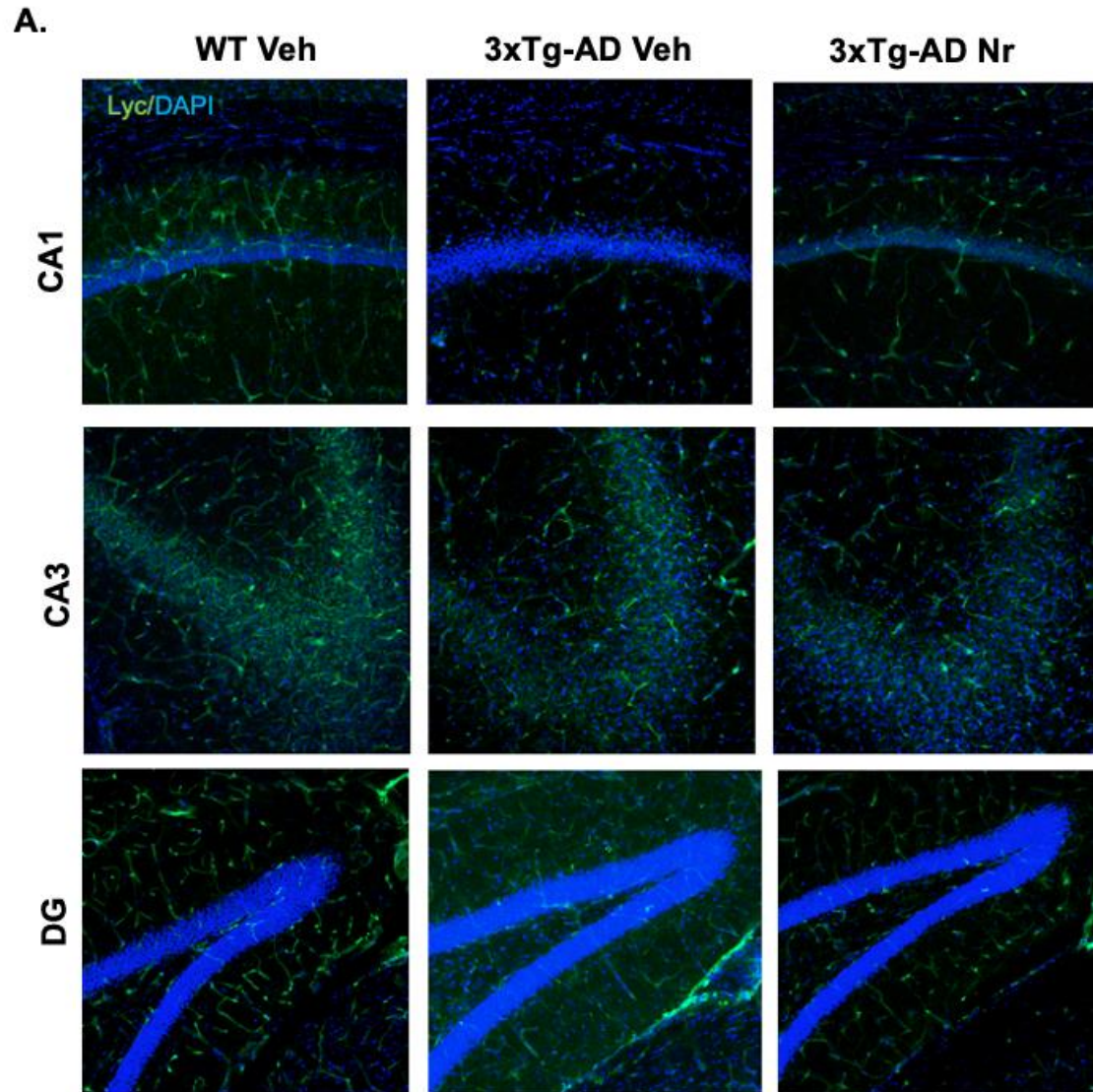
C.



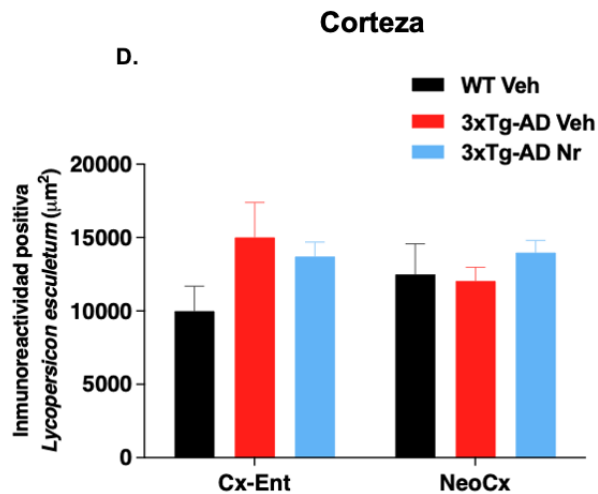
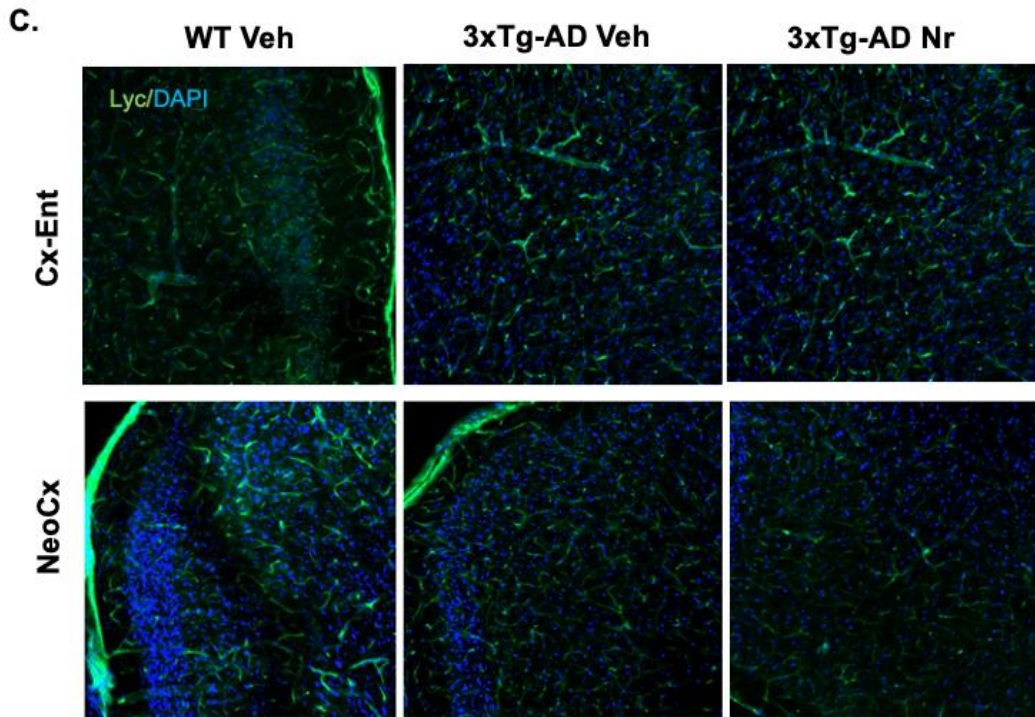


Entre los cambios patológicos asociados a la EA se ha reportado que se presentan alteraciones en la integridad y funcionalidad de la barrera hematoencefálica (BHE), el volumen cerebrovascular y el grosor de las membranas basales que rodean los microvasos. Estos hallazgos han sido detectados parcialmente en el modelo 3xTg-AD. En este trabajo se evaluó el área inmunoreactiva de vasos sanguíneos con la lectina *Lycopersicon esculentum* que se une a glicoconjugados concentrados en el glicocáliz y en la membrana basal. No se detectaron diferencias significativas en la inmunoreactividad positiva con la Lectina *Lycopersicon esculentum* entre los grupos experimentales en las regiones de hipocampo y corteza evaluadas (**Figura 6-10**).

**Figura 6-10: El extracto de *N. reticulata* no induce cambios en los vasos sanguíneos en los animales 3xTg-AD . (A)** Micrografías representativas de las regiones de cortes de hipocampo específicamente CA1, CA3 y DG para la inmunoreactividad para *Lycopersicum esculentum* (verde) que tiñe vasos sanguíneos, los núcleos fueron teñidos con DAPI (Azul). **(B)** Cuantificación del área positiva para Iba1 en las regiones del hipocampo (CA1, CA3 y DG). **(C)** Micrografías representativas de las regiones de cortes de la cortezas Cx-Ent y NeoCx para la inmunoreactividad para *Lycopersicum esculentum*. **(D)** Cuantificación del área positiva para *Lycopersicum esculentum* en las regiones de la corteza (Cx-Ent y NeoCx). Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  S.E.M. Los análisis estadísticos fueron realizados por ANOVA de dos vías seguido de un test de comparaciones múltiples de Bonferroni.





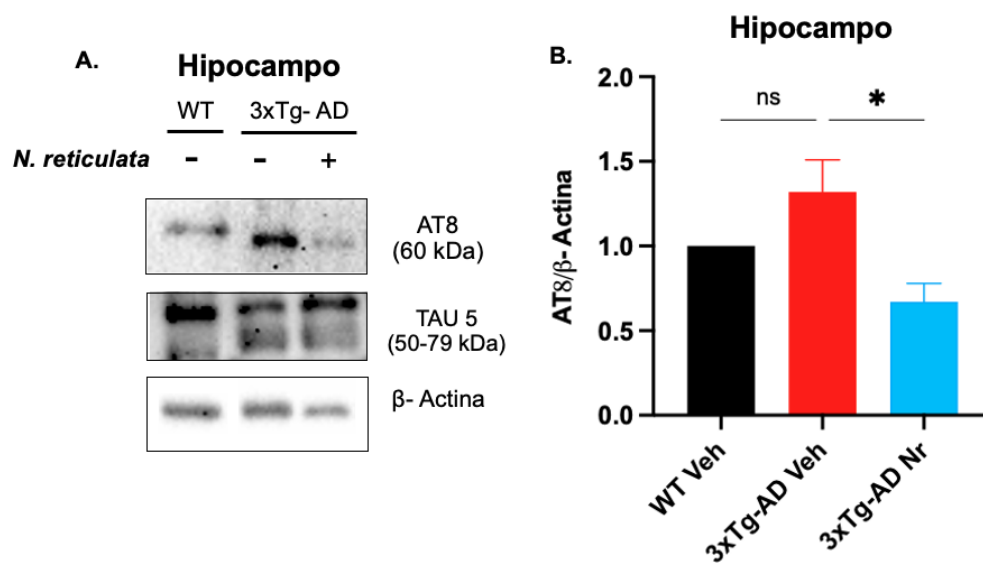


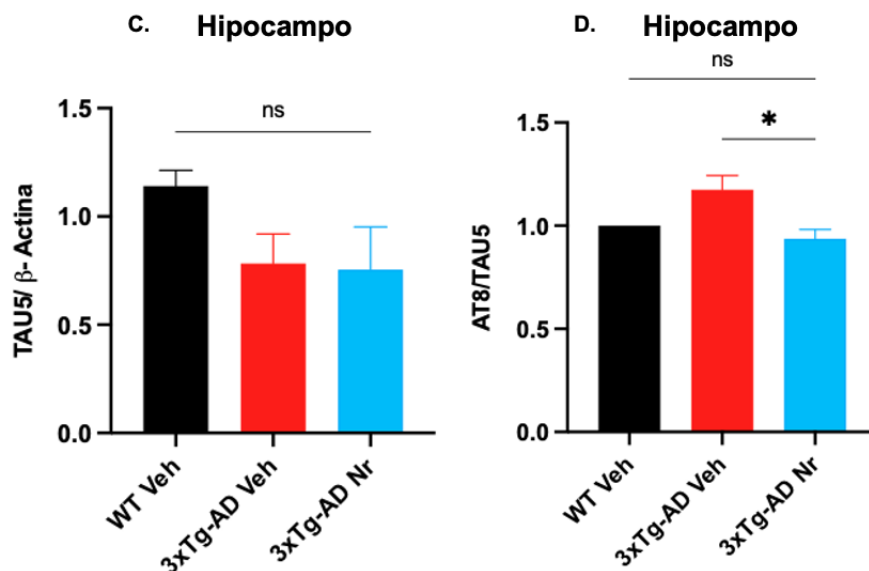
## 6.7 El tratamiento *N. reticulata* disminuye la fosforilación de Tau pero no aumenta su expresión.

Considerando el efecto observado en la fosforilación de Tau en los ensayos de inmunofluorescencia, se evaluó mediante ensayos de WB la expresión de Tau total y p-Tau usando el anticuerpo anti-AT8. El análisis densitométrico

reveló que los animales 3xTg-AD(Nr) presentan niveles reducidos estadísticamente significativos de p-Tau solubles respecto a los animales WT(Veh) ( $P < 0.05$ ) (**Figura 6-11A,B**). Respecto a la expresión de Tau total, no se observaron cambios significativos entre los grupos experimentales (**Figura 6-11A,C**). Adicionalmente, se evaluó la relación p-Tau/Tau total con el propósito de elucidar la posible relación entre la expresión de Tau y su fosforilación. Se observó, que los animales 3xTg-AD(Nr) presentan una menor relación p-Tau/Tau total respecto a los animales 3xTg-AD(Veh) ( $P < 0.05$ ) (**Figura 6-11D**)

**Figura 6-11: El extracto de *Nectandra reticulata* disminuye la fosforilación de Tau en el hipocampo, sin modificar su expresión en modelo 3xTg-AD.** Los niveles hipocampo de proteína p-Tau (AT8), Tau total (Tau-5) y  $\beta$ -actina se analizaron mediante la metodología de WB. **(A)** Imágenes representativas de los WB de p-Tau (AT8), Tau total (Tau-5) y  $\beta$ -actina en hipocampo en animales WT(Veh), 3xTg-AD(Veh) y 3xTg-AD tratados *Nectandra reticulata*. **(B)** Cuantificación densitométrica de los ensayos de WB de p-Tau (AT8), **(C)** Tau total (Tau-5), **(D)** relación p-Tau (AT8)/Tau total (Tau-5) en lisados de cerebro de hipocampo. Las muestras de cada animal fueron normalizadas contra la respuesta de  $\beta$ -actina y expresadas como la tasa de cambio. Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  S.E.M. Los análisis estadísticos fueron realizados por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. \* representa  $P < 0.05$  comparado con animales 3xTg-AD(Veh).



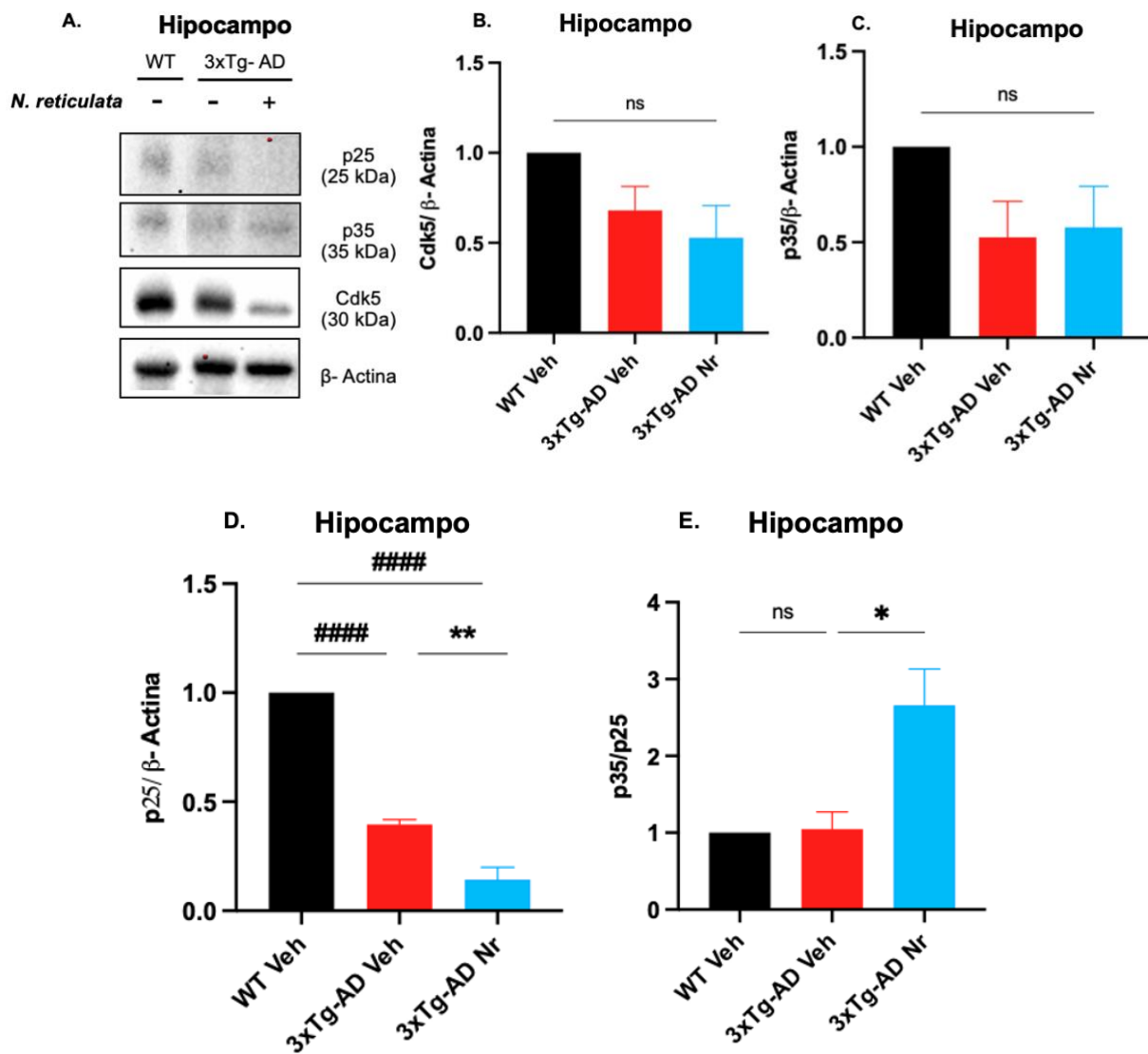


## 6.8 El tratamiento con *N. reticulata* disminuye significativamente el clivaje de p35 a p25 en los animales 3xTg-AD.

Para comprender los mecanismos involucrados en la reducción de la taupatía, se evaluó la expresión de CDK5, no se observaron diferencias significativas en su expresión entre los grupos WT(Veh) y los grupos con animales 3xTg-AD (**Figura 6-12A,B**). Teniendo en cuenta que la relación p25/p35 ha sido relacionada con el incremento de la actividad de CDK5 en la EA. Se evaluó la expresión de p35 sin registrar cambios significativos de la expresión en el hipocampo (**Figura 6-12A,B**), sin embargo, se observó una expresión reducida estadísticamente significativa de p25 en los animales 3xTg-AD(Veh) respecto a los animales WT ( $P < 0.0001$ ). Respecto a los animales 3xTg-AD(Nr) se observó que el extracto produjo una reducción estadísticamente significativa de la expresión de p25 respecto a los animales WT(Veh) y 3xTg-AD(Veh) ( $P < 0.0001$  y  $P < 0.01$  respectivamente) (**Figura 6-12A,C**). En la relación p35/p25 se observó un incremento estadísticamente significativo en los animales 3xTg-AD(Nr) en comparación con los animales 3xTg-AD y WT controles ( $P < 0.05$ ) (**Figura 6-12E**).

**Figura 6-12: El extracto de *Nectandra reticulata* disminuye los niveles de p25 en los animales 3xTg-AD. (A)** Imágenes representativas de los WB de CDK5, p35, p25 y β-actina en hipocampo en animales WT(Veh), 3xTg-AD(Veh) y 3xTg-AD(Nr). **(B)** Cuantificación de

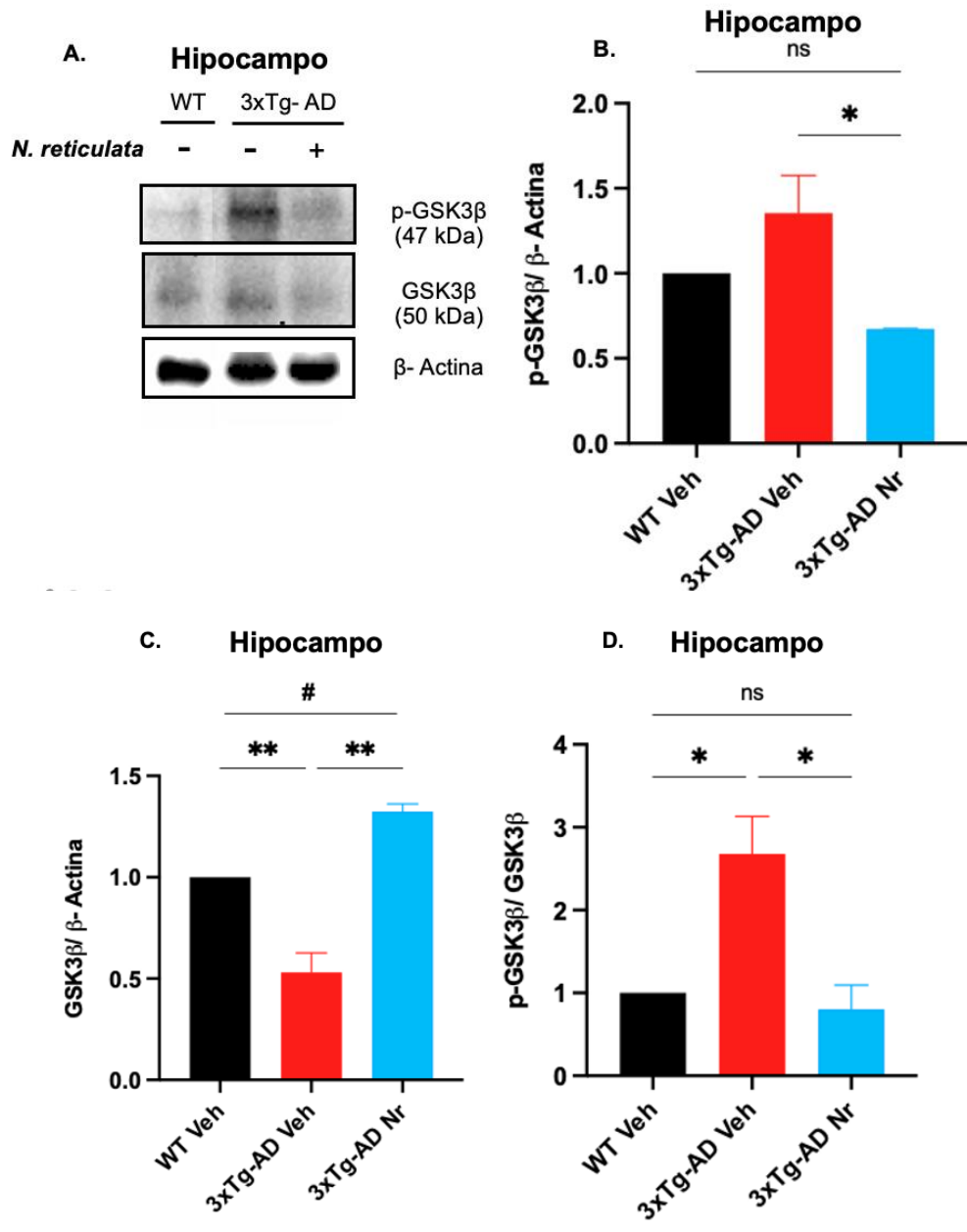
la densitometría de los ensayos de WB de CDK5, **(C)** p35, **(D)** p25, **(E)** relación p35/p25 en lisados de cerebro de hipocampo. Datos normalizados contra  $\beta$ -actina. Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  S.E.M. Los análisis estadísticos fueron realizados por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. ##### representa  $P < 0.0001$  comparado con animales WT(Veh), \* representa  $P < 0.05$ , \*\* representa  $P < 0.01$  comparado 3xTg-AD(Veh).



## 6.9 El tratamiento con *N. reticulata* reduce significativamente la fosforilación Y216 en GSK3 $\beta$ en animales envejecidos.

Al evaluar la expresión de p-GSK3 $\beta$  (pY216) se observó que los animales 3xTg-AD(Nr) presentan una reducción significativa de p-GSK3 $\beta$  en comparación con los animales 3xTg-AD(Veh) (**Figura 6-13A,B**). Se evaluó la expresión de GSK3 $\beta$  total, se observó una reducción en el grupo 3xTg-AD(Veh) respecto a WT(Veh). Adicionalmente, los animales 3xTg-AD(Nr) mostraron un incremento de GSK3 $\beta$  total respecto a los animales WT(Veh) ( $P < 0.05$ ) y los animales 3xTg-AD(Veh) ( $P < 0.01$ ) (**Figura 6-13A,C**). La relación p-GSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$  mostró un incremento significativo en animales 3xTg-AD(Veh) respecto a los animales WT(Veh) ( $p < 0.05$ ). Por su parte el extracto en animales 3xTg-AD redujo significativamente esta relación ( $p < 0.05$ ), la cual es similar equiparable a los niveles observados en los animales WT(Veh) (**Figura 6-13D**)

**Figura 6-13: El extracto de *N. reticulata* disminuye significativamente la expresión de p-GSK3 $\beta$  en animales 3xTg-AD envejecidos.** Análisis de expresión por WB de p-GSK3 $\beta$ , GSK3 $\beta$  (**A**) Imágenes representativas de los WB de p-GSK3 $\beta$ , GSK3 $\beta$  y  $\beta$ -actina en hipocampo en animales WT(Veh), 3xTg-AD(Veh) y 3xTg-AD *N. reticulata*. (**B**) Cuantificación densitométrica de los ensayos de WB de p-GSK3 $\beta$ , (**C**) GSK3 $\beta$  (**D**) relación p-GSK3 $\beta$ / GSK3 $\beta$  en lisados de hipocampo cerebral. Las muestras de cada animal fueron normalizadas contra la respuesta de actina y expresadas como la tasa de cambio. Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  S.E.M. Los análisis estadísticos fueron realizados por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. \* representa  $P < 0.05$  , \*\* representa  $P < 0.01$  respecto a los animales 3xTg-AD(Veh), # representa  $P < 0.05$  respecto a los animales WT(Veh).



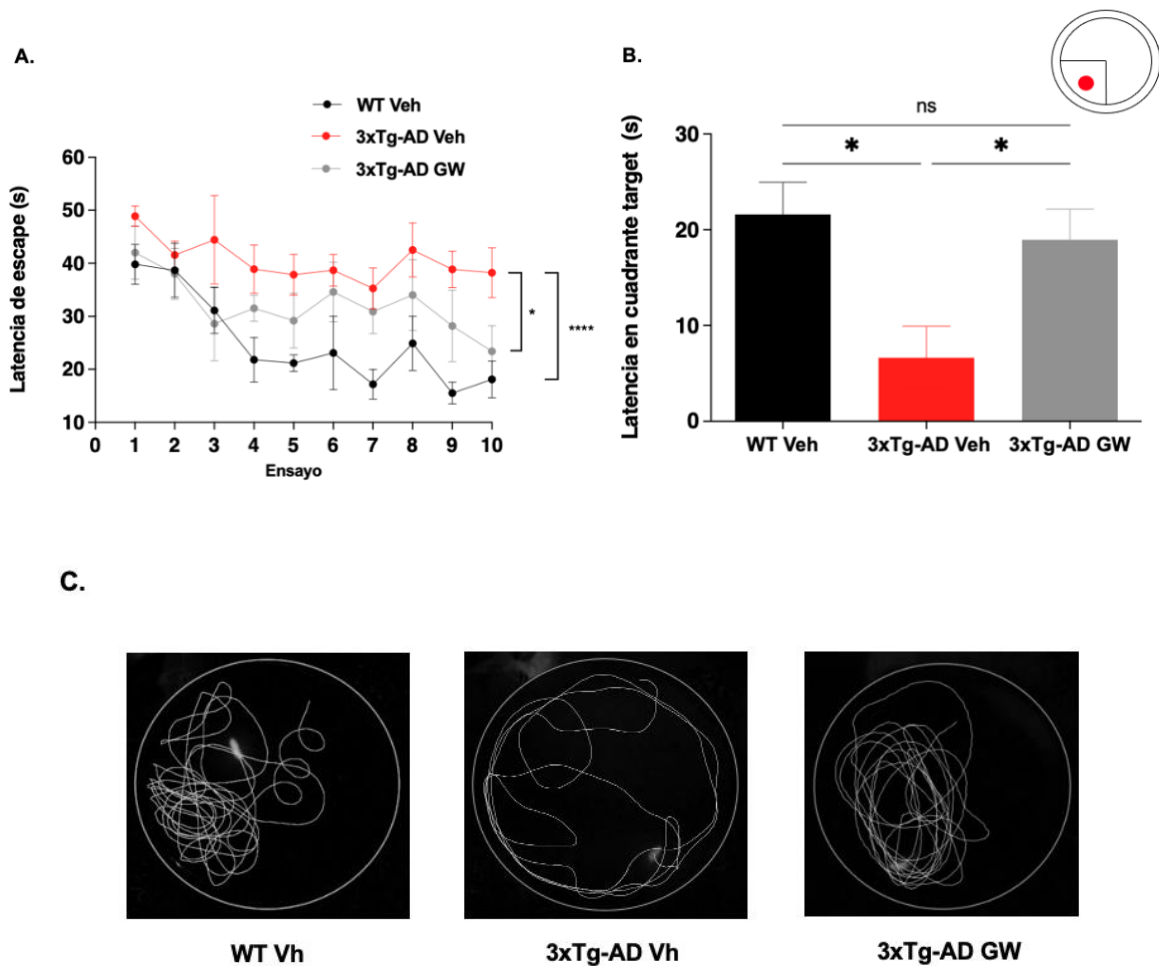
## Capítulo 7. Resultados: Tratamiento con el agonista sintético GW3965

### 7.1 El tratamiento con GW3965 mejoró significativamente el deterioro cognitivo

Luego del tratamiento con el agonista sintético GW3965 a una dosis de 33 mg/kg/día se realizó análisis comportamental usando el laberinto acuático de Morris. En la prueba de aprendizaje (**Figura 7-1A**), los animales WT(Veh) mostraron tiempos de latencia de llegada a la plataforma menores a lo largo de la prueba en comparación con los animales 3xTg-AD(Veh) ( $P < 0.0001$ ). Los animales 3xTg-AD(GW), no presentaron diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de llegada a la plataforma respecto a los animales WT(Veh). Los animales 3xTg-AD(GW) presentaron tiempos reducidos respecto a los animales 3xTg-AD(Veh) ( $P < 0.05$ ).

En la prueba de retención (**Figura 7-1B**), los animales WT(Veh) mostraron tiempos de permanencia de llegada al cuadrante de la plataforma reducidos en comparación con los animales 3xTg-AD(Veh) ( $P < 0.05$ ). Los animales 3xTg-AD(GW) presentaron una reducción significativa con respecto a los animales 3xTg-AD(Veh) ( $P < 0.05$ ). No se observaron diferencias estadísticas en las latencias entre los animales WT(Veh) y 3xTg-AD(GW).

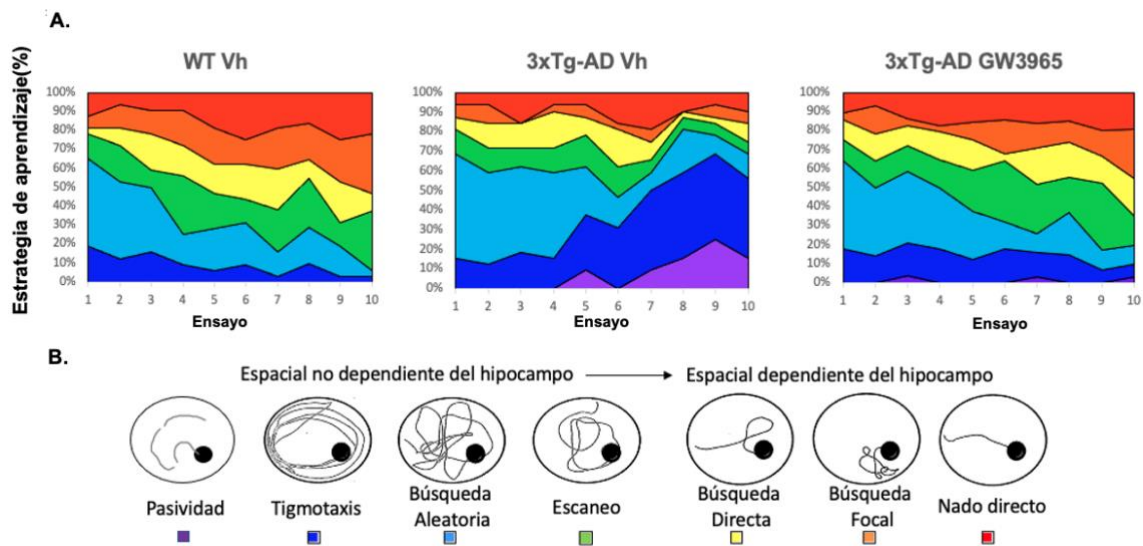
**Figura 7-1: Efecto del agonista sintético GW3965 en la memoria espacial evaluada por MWM después de 3 meses de tratamiento. (A)** Curva de aprendizaje de animales WT(Veh), 3xTg-AD(Veh), 3xTg-AD(GW). **(B)** Prueba de retención, latencia en cuadrante target en segundos. **(C)** Recorridos representativos de la prueba de retención. Todos los datos fueron expresados como la media  $\pm$  S.E.M. \*\*\*\* representa  $P < 0.0001$  o \* representa  $P < 0.05$  comparado con 3xTg-AD(Veh).



En la prueba de aprendizaje, se realizó un análisis de las estrategias de navegación espacial dependientes (Van der Jeugd, 2018) (**Figura 7-2A**). Se observó que los animales WT(Veh) y 3xTg-AD(GW) usan mayoritariamente estrategias de aprendizaje dependientes del hipocampo que aumentaron en frecuencia con el número de ensayos. Por otra parte, los animales 3xTg-AD(Veh) mantienen un porcentaje elevado de estrategias no dependientes del hipocampo durante el desarrollo de la prueba.

**Figura 7-2: Efecto de GW3965 en las estrategias de navegación espacial durante la prueba de aprendizaje por MWM. (A)** Efecto de los tratamientos sobre las estrategias de aprendizaje de los diferentes grupos experimentales. **(B)** Representación esquemática de las estrategias utilizadas en la prueba de comportamiento del laberinto acuático de Morris.

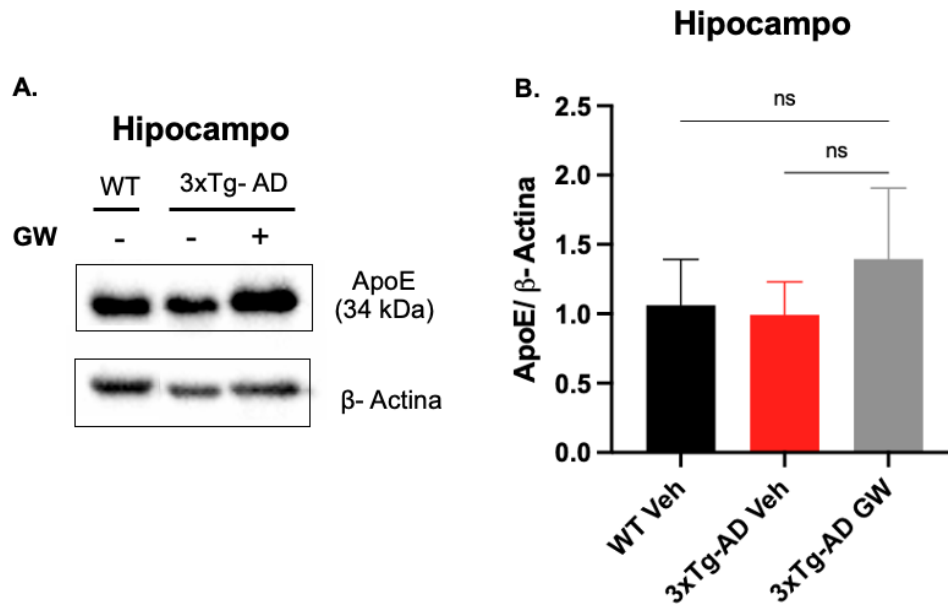




## 7.2 El tratamiento con GW3965 no produjo cambios significativos en la expresión de ApoE

Con el propósito de evaluar el nivel de expresión de ApoE, se realizó Western Blot (WB) de lisados proteicos de hipocampo de animales WT(Veh), 3xTg-AD(Veh) y 3xTg-AD(GW). Los animales tratados con GW3965, no presentaron cambios detectables de la expresión de ApoE respecto a los animales WT(Veh) ni 3xTg-AD(Veh). Sin embargo, se observa una tendencia al aumento de su expresión en animales 3xTg-AD(GW) (**Figura 7-3A,B**).

**Figura 7-3: Efecto de GW3965 en la expresión de ApoE en el hipocampo de animales 3xTg-AD.** (A) Imágenes representativas de WB de ApoE y  $\beta$ -actina en hipocampo en animales WT(Veh), 3xTg-AD(Veh) y 3xTg-AD(GW). (B) Cuantificación densitométrica de los inmunoblots de ApoE. Las muestras fueron normalizadas contra la respuesta de  $\beta$ -actina y expresadas como la tasa de cambio (fold change). Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  S.E.M. Los análisis estadísticos fueron realizados por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

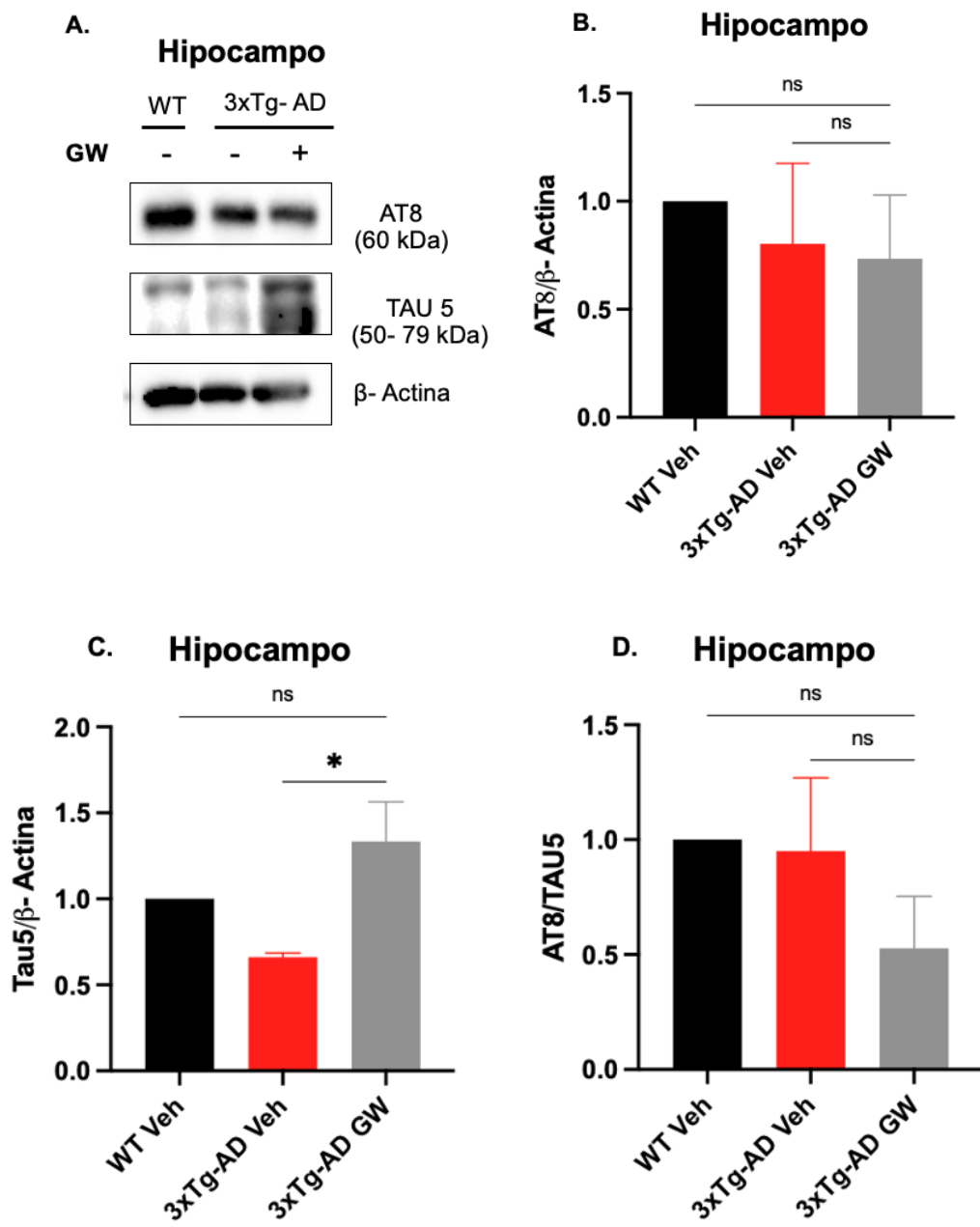


### 7.3 Cambios asociados a la taupatía mediados por el tratamiento con GW3965 en el modelo 3xTg-AD

En cuanto al análisis de Tau fosforilado y Tau total en los animales tratados con el agonista sintético, no se observaron cambios significativos con el marcador AT8 entre los grupos experimentales (**Figura 7-4A,B**). Sin embargo, al evaluar el marcador para Tau total (TAU 5) se observó un incremento estadísticamente significativo de la densitometría en los animales 3xTg-AD(GW) respecto a los animales 3xTg-AD(Veh) ( $P < 0.05$ ) (**Figura 7-4A,C**). Cuando se evaluó la relación entre los marcadores AT8 y Tau5, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (**Figura 7-4D**).

**Figura 7-4: El agonista sintético GW3965 incrementa los niveles de Tau en el hipocampo en modelo 3xTg-AD (A)** Imágenes representativas de los WB de p-Tau (AT8), Tau total (Tau-5) y β-actina en hipocampo en animales WT(Veh), 3xTg-AD(Veh) y 3xTg-AD tratados con GW3965. **(B)** Cuantificación de la densitometría de los ensayos de WB de p-Tau (AT8), **(C)** Tau total (Tau-5) y **(D)** relación p-Tau (AT8)/ Tau total (Tau-5) en lisados de cerebro de hipocampo. Los datos fueron normalizados contra β-actina y expresados como la tasa de cambio (fold change). Los datos fueron expresados como la media ± S.E.M. Los análisis estadísticos fueron realizados por ANOVA de una vía seguido de una prueba

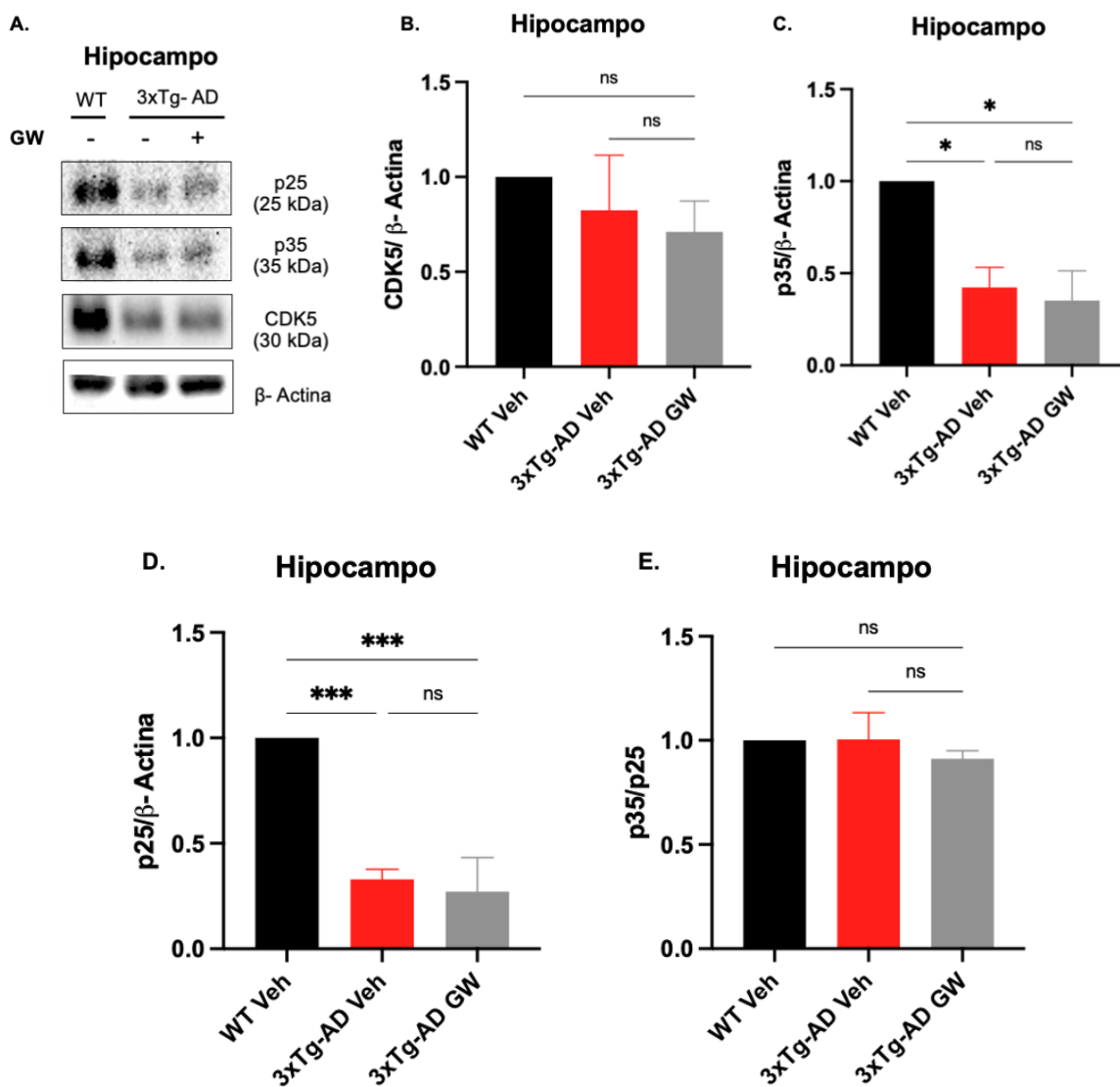
de comparaciones múltiples de Tukey. \* representa  $P < 0.05$  comparado con animales 3xTg-AD(Veh).



## 7.4 El tratamiento con el agonista sintético GW3965 no modifica la expresión de CDK5

En cuanto a los animales tratados con el agonista sintético, no se evidenciaron diferencias significativas entre los grupos en la expresión de CDK5 (**Figura 7-5A,B**). Sin embargo, al evaluar p35 se observó una reducción estadísticamente significativa en los grupos 3xTg-AD(Veh) y 3xTg-AD(GW3965) respecto a los animales WT(Vh) ( $P < 0.05$ ) (**Figura 7-5A,B**). Cuando se evaluó p25, se observó una reducción estadísticamente significativa en los grupos 3xTg-AD(Veh) y 3xTg-AD(GW3965) respecto a los animales WT(Vh) ( $P < 0.001$ ) (**Figura 7-5A,C**). Adicionalmente, no se observaron cambios significativos en la relación p35/p25 entre los grupos experimentales (**7-5D**).

**Figura 7-5: GW3965 disminuye los niveles de p25 en los animales WT.** Los niveles de proteína en hipocampo de CDK5, p35, p25 y  $\beta$ -actina se analizaron mediante la metodología de WB. **(A)** Imágenes representativas de los WB de CDK5, p35, p25 y  $\beta$ -actina en hipocampo en animales WT(Veh), 3xTg-AD(Veh) y 3xTg-AD GW3965. **(B)** Cuantificación de la densitometría de los ensayos de WB de CDK5, **(C)** p35, **(D)** p25, **(E)** relación p35/p25 en lisados de cerebro de hipocampo. Las muestras de cada animal fueron normalizadas contra la respuesta de actina y expresadas como la tasa de cambio. Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  S.E.M. Los análisis estadísticos fueron realizados por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. \* representa  $P < 0.05$ , \*\*\* representa  $P < 0.001$  respecto a los animales WT(Veh).

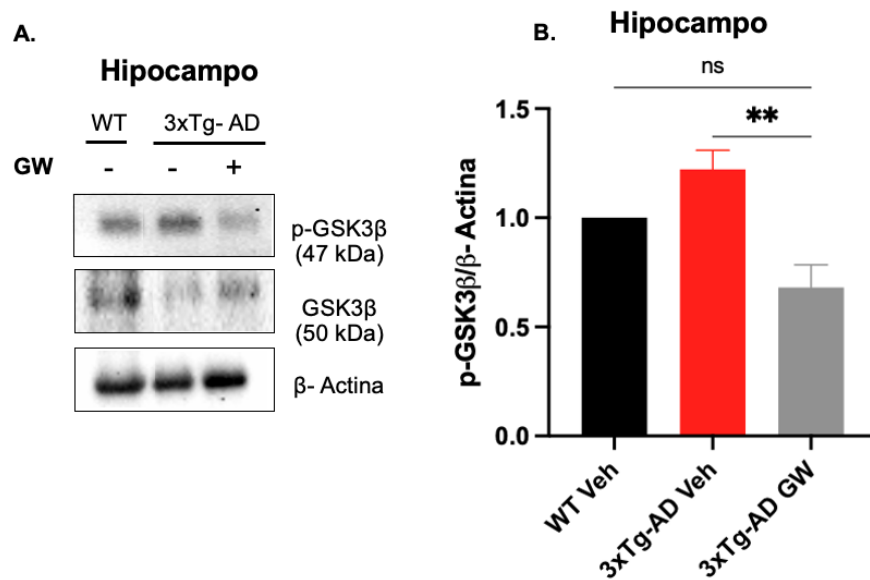


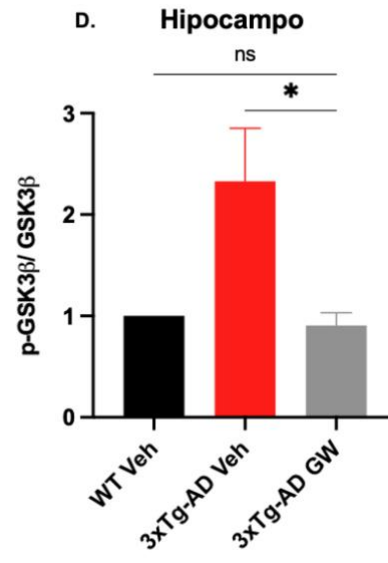
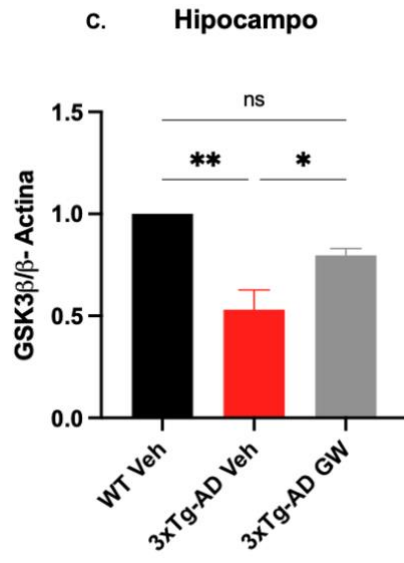
## 7.5 El tratamiento con GW3965 reduce significativamente la fosforilación Y216 de GSK3β en animales envejecidos

En cuanto a la evaluación de la expresión y activación de GSK3β, se observó que los animales 3xTg-AD(GW) presentaron una reducción significativa de la fosforilación de GSK3β en el residuo tirosina 216 (Y216) respecto a los animales 3xTg-AD(Veh) ( $P < 0.001$ ) (**Figura 7-6A,B**). En cuanto a la expresión de GSK3β (**Figura 7-6A,C**), se observó que los animales 3xTg-AD(Veh) presentan una reducción estadísticamente significativa respecto al control WT(Veh) ( $P < 0.001$ ). El tratamiento con el agonista produjo un incremento

estadísticamente significativo en los animales 3xTg-AD ( $P < 0.05$ ) recuperando la expresión de la proteína. Se observó que la relación p-GSK3 $\beta$ /GSK3 $\beta$ , redujo de manera estadísticamente significativa en los animales 3xTg-AD(GW) respecto a los animales 3xTg-AD(Veh) ( $P < 0.05$ ) (**Figura 7-6D**).

**Figura 7-6: El agonista sintético incrementa los niveles de expresión de GSK3 $\beta$  y reduce su fosforilación en animales 3xTg-AD envejecidos. (A)** Imágenes representativas de los WB de p-GSK3 $\beta$ , GSK3 $\beta$  y  $\beta$ -actina en hipocampo en animales WT(Veh), 3xTg-AD(Veh) y 3xTg-AD GW3965. **(B)** Cuantificación de la densitometría de los ensayos de WB de p-GSK3 $\beta$ . **(C)** GSK3 $\beta$ . **(D)** relación p-GSK3 $\beta$ / GSK3 $\beta$  en lisados de cerebro de hipocampo. Las muestras de cada animal fueron normalizadas contra la respuesta de actina y expresadas como la tasa de cambio. Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  S.E.M. Los análisis estadísticos fueron realizados por ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. \* representa  $P < 0.05$ , \* representa  $P < 0.001$  respecto a los animales 3xTg-AD(Veh).



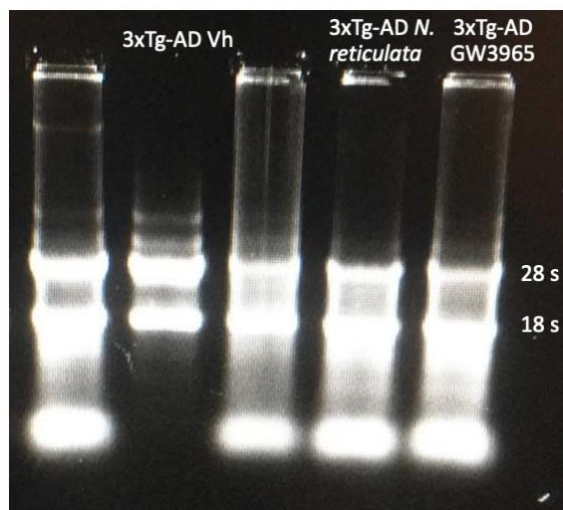


## Capítulo 8. Resultados adicionales: Análisis de expresión diferencial

### 8.1 Análisis de expresión diferencial entre los animales tratados con *N. reticulata* y los animales control.

Con el propósito de evaluar la expresión diferencial de genes tras el tratamiento con el extracto de *N. reticulata*, se realizó la extracción de RNA de hipocampos de animales tratados y sus respectivos controles, se usaron tres réplicas en cada grupo experimental. Tras la extracción se realizó un gel de agarosa con la metodología de “Bleach Gel” para analizar la calidad del RNA extraído, evaluando las bandas de RNA ribosomal 18s y 28s (**Figura 8-1**). La calidad y cantidad de las muestras fueron confirmadas por el control de calidad por el proveedor del servicio de secuenciación (MACROGEN).

**Figura 8-1:** Imagen representativa del gel de agarosa con metodología de blanqueo con subunidades ribosomales 28s y 18s. Imagen tomada en fotodocumentador.

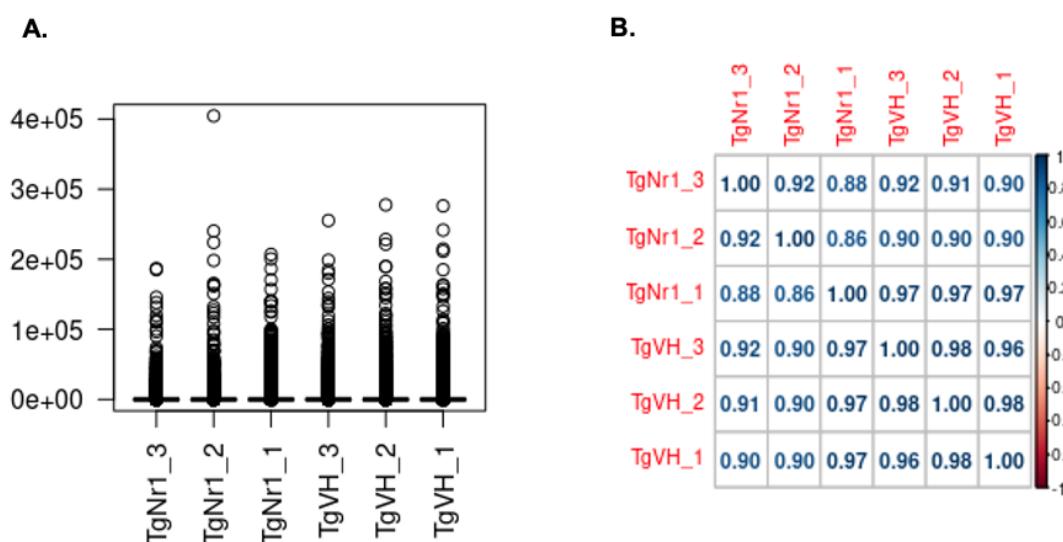


En este capítulo, las réplicas del grupo control 3xTg-AD(Veh) fueron nombradas TgVH\_1, TgVH\_2 y TgVH\_3; mientras que las réplicas de los animales 3xTg-AD(Nr) fueron nombradas TgNr\_1, TgNr\_2 y TgNr\_3. Inicialmente se evaluó la distribución de los datos la secuenciación de RNA de hipocampo de los grupos 3xTg-AD(Nr) y 3xTg-AD(Veh) usando un BoxPlot (**Figura 8-2A**), teniendo en cuenta el valor central de la mediana y la variabilidad



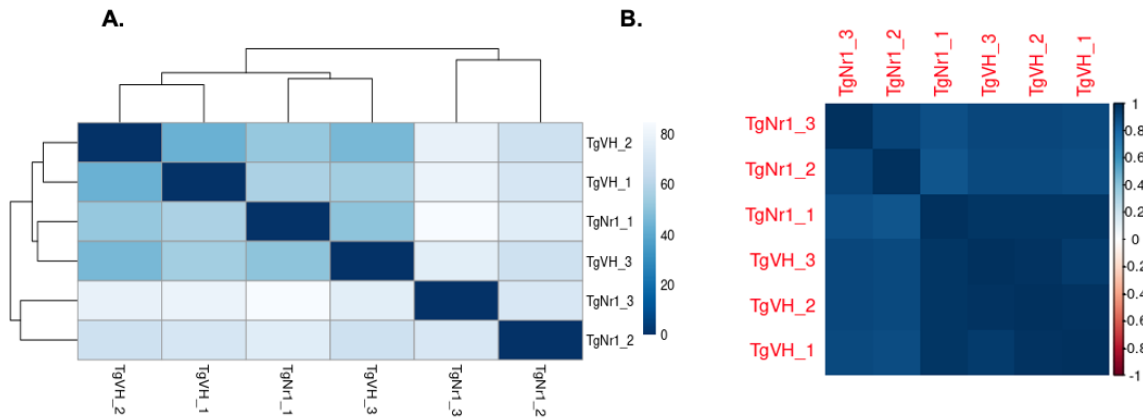
a través del rango intercuartílico para la detección de datos atípicos, en el caso de la replica TgNr\_2, se observa valores atípicos con 400.000 conteos, a diferencia de los conteos de genes para las otras replicas que presentan datos inferiores a 300.000 conteos. Adicionalmente, se realizó un correlograma que permite detectar muestras defectuosas a partir de las relaciones entre las variables, en el gráfico obtenido se observan correlaciones positivas superiores a 0.86 entre las replicas de los grupos experimentales (**Figura 8-2B**).

**Figura 8-2: Conteo de genes y correlación entre 3xTg-AD(Nr) y 3xTg-AD(Veh).** (A) Boxplot de conteo para cada uno de los genes. (B) Correlograma entre las muestras.



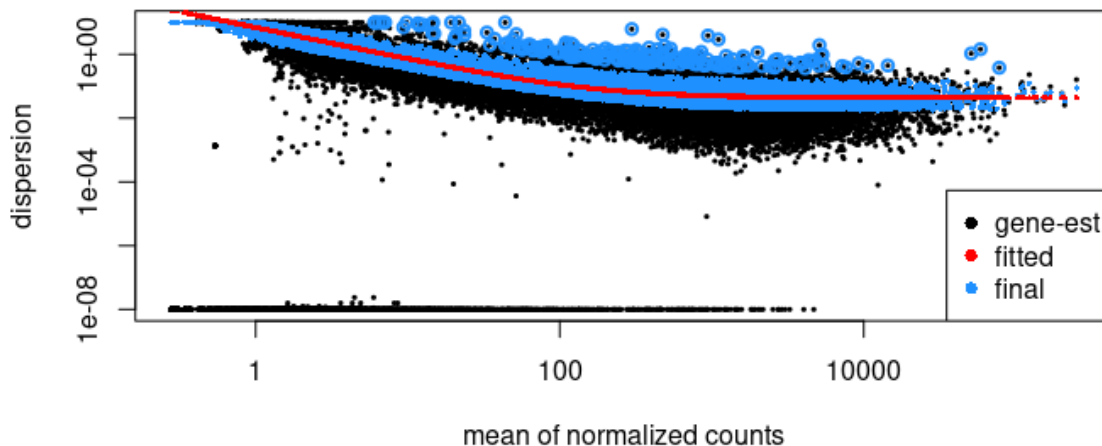
Una vez normalizados los datos, se obtuvo un Heatmap para establecer la correlación entre las réplicas de cada grupo experimental, a la vez que se agruparon en clusters de acuerdo a sus similitudes en los patrones de expresión (**Figura 8-3A**). Estos datos muestran dos grandes clusters: en el primer cluster se encuentran las muestras de los animales 3xTg-AD(Veh) TgVH\_1, TgVH\_2, TgVH\_3 y la réplica 3xTg-AD(Nr) TgNr\_1; en el segundo cluster encontramos los animales 3xTg-AD(Nr) TgNr\_2 y TgNr\_3. Adicionalmente se obtuvo una matriz de correlación de los datos normalizados, que permite detectar muestras defectuosas a partir de las relaciones entre las variables, en el caso global de las muestras se observaron valores superiores a 0.8 en las correlaciones. (**Figura 8-3B**).

**Figura 8-3: Correlaciones normalizadas para los datos de los animales 3xTg-AD(Nr) y 3xTg-AD(Veh).** (A) Heatmap de correlaciones (B) Correlograma entre las muestras normalizadas.



El análisis de estimación de dispersión de los datos (**Figura 8-4**) muestra los coeficientes de dispersión gen por gen (puntos negros) estimado para las seis (6) muestras (eje y) en relación al promedio de conteos normalizados (eje x). La línea de tendencia roja es el ajuste del modelo lineal que construye Deseq2 y los puntos azules corresponden al ajuste de los datos a ese modelo. En general los coeficientes de dispersión se encuentran agrupados en la línea de tendencia roja y otro subconjunto se encuentran con una dispersión de  $1e-8$  y corresponden a conteos medios alrededor de 0 y 8000 conteos.

**Figura 8-4:** Gráfica de estimación de dispersión para los datos de los animales 3xTg-AD(Nr) y 3xTg-AD(Veh).



Una vez evaluada la calidad de los datos mediante las gráficas de estadística descriptiva descritas previamente y realizado el análisis de expresión diferencial con DESeq2, se realizó el análisis de los DEGs usando la herramienta de anotación Gene Ontology (**Tabla**

**8-5).** Se obtuvieron 3 genes expresados diferencialmente a la alza entre los animales 3xTg-AD(Nr) respecto a los animales 3xTg-AD(Veh). Los genes expresados diferencialmente son: *Apold1*, *Fabp7* y *Gem*, los cuales codifican proteínas asociadas a mecanismos de unión a proteínas, transducción de señales, unión de lípidos, angiogénesis, neurogénesis entre otros relacionados en la tabla 8-5.

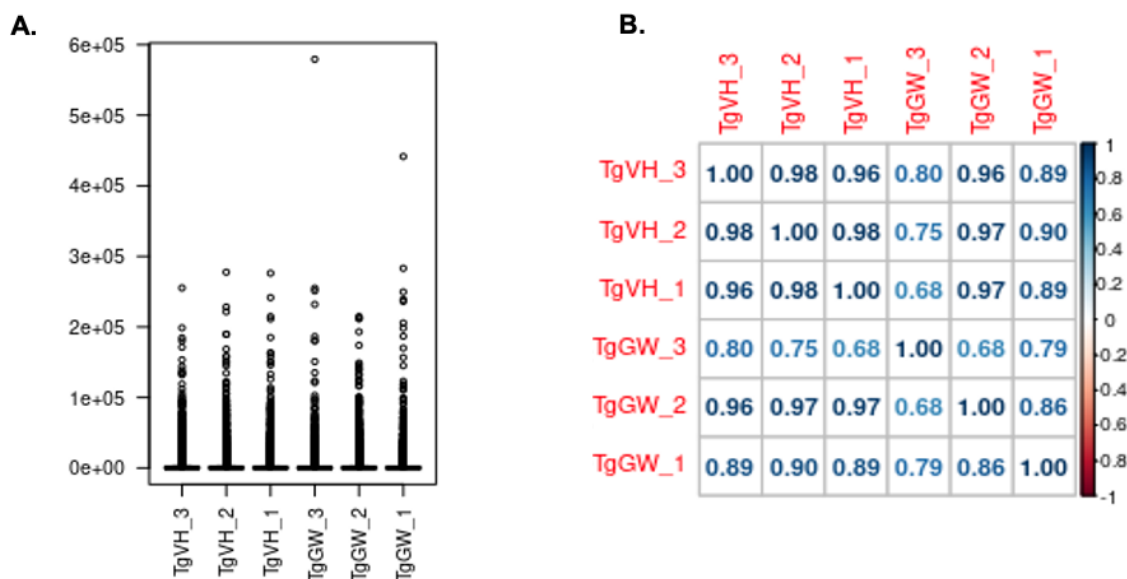
**Tabla 8-1: Genes expresados diferencialmente y su categoría funcional para los animales 3xTg-AD(Nr) respecto a los animales 3xTg-AD(Veh)**

Nombre del gen	Nombre de la proteína	Log2 Fold change	P value	Categoría funcional Gene Ontology
<i>Gem</i>	Proteína de unión a GTP sobreexpresada en el músculo esquelético	1,7433578	6,3980E-06	Unión de nucleótidos Transducción de señales Ciclo celular mitótico Actividad de GTPasa Unión de proteínas
<i>Apold1</i>	Dominio 1 que contiene la apolipoproteína L	1,2523980	1,6397E-06	Unión a lípidos Angiogénesis Regulación de la diferenciación de células endoteliales
<i>Fabp7</i>	Proteína de unión a ácidos grasos 7	1,7323396	6,4404E-06	Unión a lípidos Unión a ácidos grasos Neurogénesis Proliferación celular en el prosencéfalo

## 8.2 Análisis de expresión diferencial entre los animales tratados con GW3965 y los animales control.

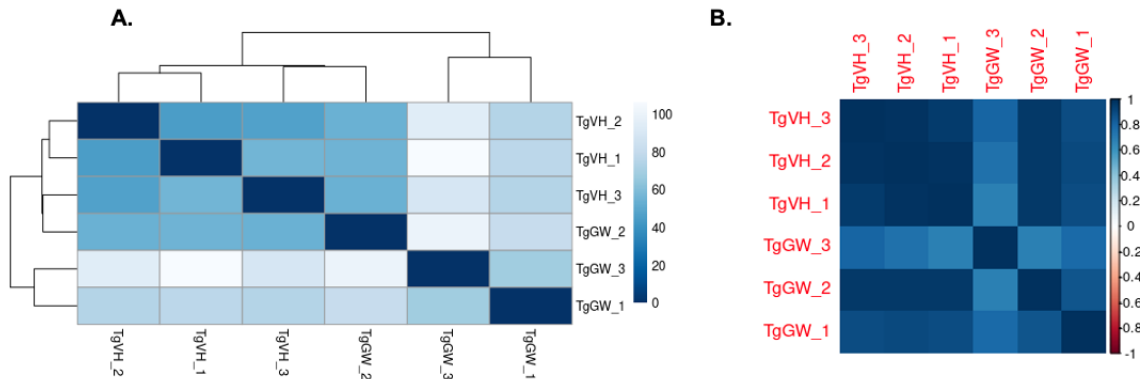
Las réplicas del grupo tratado con el agonista sintético 3xTg-AD(GW) fueron nombradas TgGW\_1, TgGW\_2 y TgGW\_3, los cuales fueron comparados con los animales 3xTg-AD(Veh). El análisis de distribución de datos, mostró dos datos atípicos para las muestras de TgGW\_1 y TgGW\_2 con conteos superiores a los 400.000, mientras que la distribución para la mayoría de los genes se encuentra en valores inferiores a los 300.000 conteos (**Figura 8-5A**). Se observó en el correlograma correlaciones de 0,68 para la réplica TgGW\_3 respecto a la muestra TgVH\_1, mientras que para las demás correlaciones se observaron valores superiores a 0,86 (**Figura 8-5B**).

**Figura 8-5:** Conteo de genes y correlación entre 3xTg-AD(GW) y 3xTg-AD(Veh). **(A)** Boxplot de conteo para cada uno de los genes. **(B)** Correlograma entre las muestras.



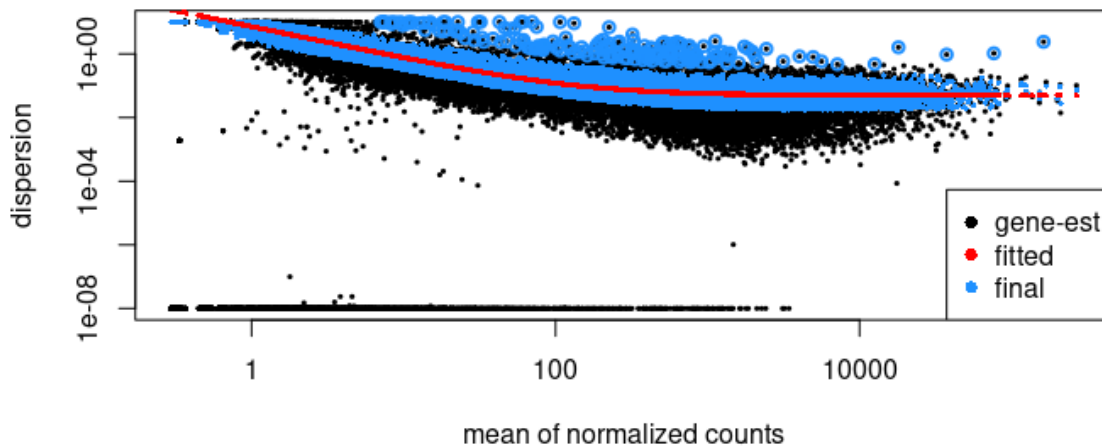
El heatmap (**Figura 8-6A**) mostró dos grandes clusters, el primer cluster agrupa las réplicas TgVH\_1, TgVH\_2, TgVH\_3 y TgGW\_2, mientras que el segundo cluster agrupa las réplicas TgGW\_1 y TgGW\_3. Por otro lado, en la matriz de correlación de datos normalizados se observó correlaciones superiores a 0.68, donde las correlaciones más bajas se encontraron respecto a los animales TgGW\_3 (**Figura 8-6B**).

**Figura 8-6:** Correlaciones normalizadas para los datos de los animales 3xTg-AD(GW) y 3xTg-AD(Veh). **(A)** Heatmap de correlaciones **(B)** Correlograma entre las muestras normalizadas.



El análisis de estimación de dispersión de los datos **(Figura 8-7)** mostró que los coeficientes de dispersión se encuentran agrupados en la línea de tendencia roja y otro subconjunto se encuentra con una dispersión de  $1e-8$  y corresponden a conteos medios alrededor de 0 y 8000 conteos.

**Figura 8-7:** Grafica de estimación de dispersión para los datos de los animales 3xTg-AD(GW) y 3xTg-AD(Veh).



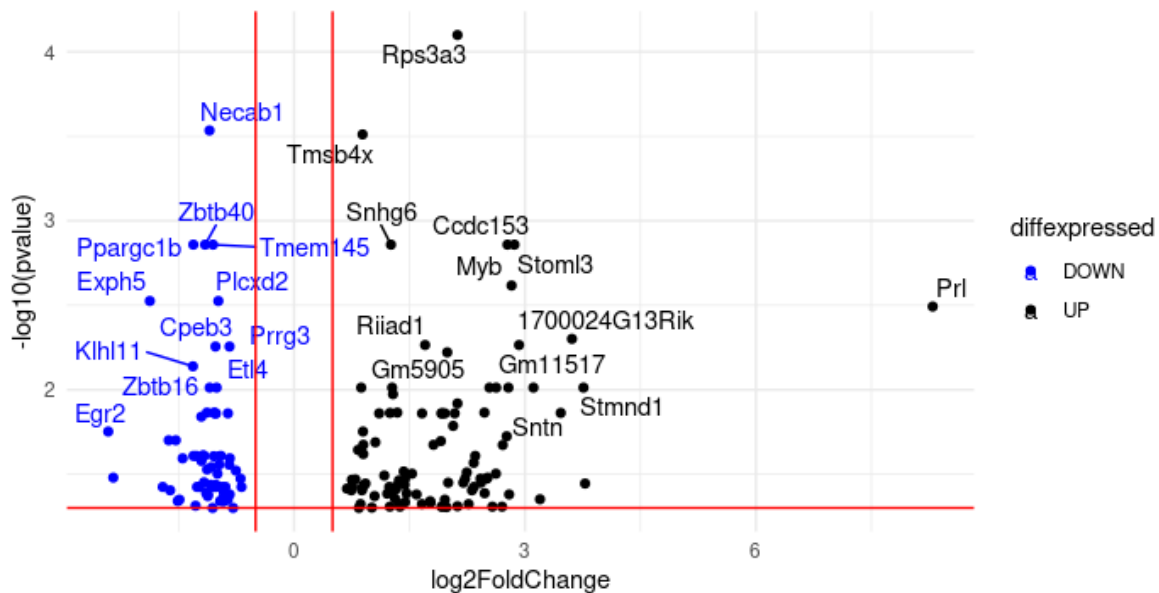
El análisis de los DEGs determinó un total de 161 genes expresados diferencialmente en los animales 3xTg-AD(GW) respecto a los controles, de los cuales 91 están expresados a la alza y 68 a la baja. En el diagrama de dispersión Volcano plot **(Figura 8-8)** en el que se muestra la significación estadística (valor P) frente a la magnitud de cambio

(Log2FoldChange), se observan los genes con los más grandes cambios significativos. En esta gráfica los genes más regulados a la alza se encuentran a la derecha y los genes más regulados a la baja se encuentran hacia la izquierda, de igual forma los genes estadísticamente más significativos se encuentran en la parte superior.

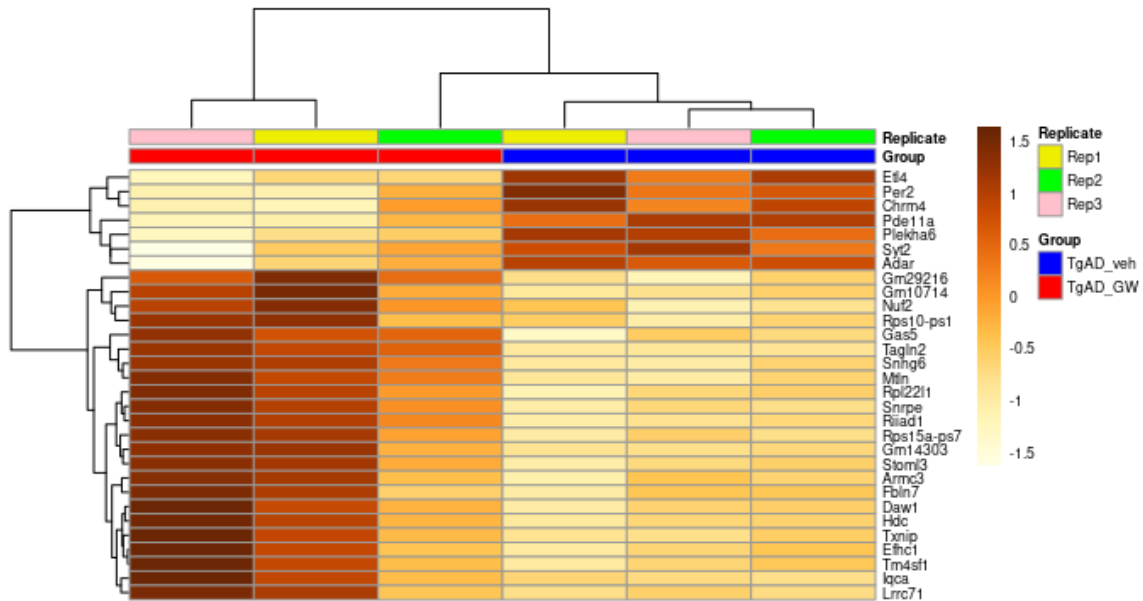
Se observó que el gen regulado a la alza con mayor significancia estadística es el gen *Rps3a3* y el gen regulado a la baja con mayor significancia estadística corresponde al gen *Necab1*.

Adicionalmente, se observó en el heatmap los 30 genes más variables en función de su expresión génica de acuerdo a grupo experimental y la réplica, esta gráfica agrupa las réplicas en 2 grandes clusters de acuerdo a la expresión de estos genes. El primer cluster agrupa las réplicas TgVH\_1, TgVH\_2, TgVH\_3 y TgGW\_2, mientras el segundo cluster agrupa las réplicas TgGW\_1 y TgGW\_3. En esta gráfica se observó que los primeros 7 genes se expresan a la baja en el segundo cluster y a la alza en los animales del primer cluster, por otro lado, los 23 genes restantes se expresan a la alza en el segundo cluster y a la baja en el primer cluster.

**Figura 8-8:** Volcano plot de genes expresados a la alta y la baja en los animales 3xTg-AD(GW) respecto a los 3xTg-AD(Veh).



**Figura 8-9: Heatmap de los 30 genes con mayor significancia estadística en los animales 3xTg-AD(GW) respecto a los 3xTg-AD(Veh).**



El análisis de anotación de genes realizado con la plataforma DAVID determinó que los 91 genes expresados a la alza, se encuentran agrupados en 28 categorías funcionales representadas en la tabla 8-2, en las que se destacan categorías de función en el citoplasma, unión a proteínas y componente integral de la membrana plasmática. Por otro lado, los 68 genes expresados a la baja se encuentran agrupados en 128 categorías representadas en la tabla 8-3.

**Tabla 8-2: Genes expresados diferencialmente a la alza y su categoría funcional para los animales 3xTg-AD(GW) respecto a los animales 3xTg-AD(Veh)**

<b>Categoría</b>	<b>Número de genes</b>	<b>Porcentaje (%)</b>	<b>Gen</b>	<b>Log2Fold Change</b>
Citoplasma	26	29,9	<i>Armc3</i>	2,35326
			<i>Got111</i>	2,47309
Unión a proteína	19	21,8	<i>Tll6</i>	2,57636
			<i>Isl1</i>	3,1100
Exosoma extracelular	16	18,4	<i>Slc6a19</i>	2,7023

			<i>Fbln7</i>	2,1230
Acetilación	16	18,4	<i>Uox</i>	2,7939
Componente integral de la membrana plasmática	8	9,2	<i>Cav1</i>	0,8317
			<i>Slc14a2</i>	2,2221
Complejo de ribonucleoproteína intracelular	7	8,0	<i>Pih1d2</i>	1,9138
			<i>Rpl39</i>	1,4630
Dineína	2	2,3	<i>Dynlrb2</i>	2,2675
			<i>Dnali1</i>	2,3369
Ribosoma	5	5,7	<i>Rps27a</i>	1,26126
			<i>Rpl30</i>	1,0457
Dendrita	8	5,2	<i>Ctla2a</i>	1,81177
			<i>Hdc</i>	1,9268
Dominio EGF	5	3,2	<i>Fbln7</i>	2,1230
			<i>Tek</i>	1,2461
Proyección celular	9	5,8	<i>Sntn</i>	3,4645
			<i>Tll6</i>	2,57636

**Tabla 8-3: Genes expresados diferencialmente a la baja y su categoría funcional para los animales 3xTg-AD(GW) respecto a los animales 3xTg-AD(Veh)**

<b>Categoría</b>	<b>Número de genes</b>	<b>Porcentaje (%)</b>	<b>Gen</b>	<b>Log2Fold Change</b>
Fosfoproteínas	39	58,2	<i>Grik3</i>	-1,0393
			<i>Pde11a</i>	-1,1685
Membrana	29	43,3	<i>Chrm4</i>	-1,2797
			<i>Tmem145</i>	-1,0530
Splicing alternativo	24	35,8	<i>Cntn4</i>	-1,0390



			<i>Egr2</i>	-2,4141
Unión a proteína	23	34,3	<i>Uba6</i>	-1,0745
			<i>Ppargc1b</i>	-1,3082
Glicoproteínas	21	31,3	<i>Oprm1</i>	-2,3485
			<i>Hs6st3</i>	-1,5363
Núcleo	19	28,4	<i>Npas4</i>	-1,4472
			<i>Cpeb3</i>	-1,0207
Memoria o aprendizaje	3	1,9	<i>Egr1</i>	-1,6095
Sinapsis	6	3,9	<i>Cntnap4</i>	-0,8421
			<i>Syt2</i>	-1,51083

## Capítulo 9. Análisis de resultados

La activación del receptor nuclear LXR es una alternativa terapéutica promisoriosa para la terapéutica de la EA, que ha cobrado importancia considerando la creciente evidencia que indica la capacidad de estas moléculas de reducir la carga amiloide, la astrogliosis e incrementar proteínas asociadas con la sinapsis, procesos que se han relacionado con la reversión del deterioro cognitivo en modelos *in vivo* para la EA (Koldamova, R. 2005; P.Zelcer, 2007; Donkin, 2010; Sandoval- Hernández A.G, 2015; Stachel, S. J, 2016).

En el presente trabajo estudiamos el potencial efectos de un extracto etanólico de hojas de *Nectandra reticulata* administrado en una dosis 25 mg/kg/día y el agonista de LXR GW3965 administrado a una dosis de 33 mg/kg/día en animales 3xTg-AD durante 12 semanas. Se evaluaron cambios sobre la patología amiloide, la taupatía, la expresión de ApoE, la astrogliosis, la neuroinflamación, la vasculatura, además de las quinasas CDK5 y GSK3 $\beta$ . Adicionalmente, se realizó un análisis de expresión génica de los hipocampos de los animales tratados con el extracto y el agonista sintético.

El planteamiento de evaluar el *efecto in vivo* del extracto de *N. reticulata* surge de una serie de estudios preliminares realizados en alrededor de 120 extractos provenientes de diferentes familias de plantas nativas del territorio colombiano, incluyendo *Rutaceae*, *Lauraceae*, *Miristeceae*, y *Piperaceae*, cuyos resultados mostraron que el extracto de *N. reticulata* presenta moléculas con la mayor actividad agonista de LXR $\beta$  en el conjunto de extractos evaluados, así mismo una potente actividad antioxidante, actividad neuroprotectora frente a toxinas tales como la ceramida y paraquat y bajas concentraciones letales en líneas celulares (datos en proceso de publicación, Bustos, 2021). Dichos resultados en conjunto sugieren un potencial farmacológico susceptible de evaluación en modelos *in vivo* de la EA.

Inicialmente, se realizó el tratamiento con el extracto de *N. reticulata* por vía oral durante 3 meses utilizando una dosis baja recomendada para tratamientos iniciales de largo término de 25 mg/kg/día (Excipients–Handbooks, 2006). Se trataron animales con el agonista sintético GW3965 a una dosis de 33 mg/Kg/día previamente usada (Sandoval- Hernández A.G., 2015; Donkin JJ,2010). El agonista GW3965 se utilizó como control y adicionalmente

para caracterizar efectos mediados por el LXR que no habían sido caracterizados previamente, los cuales incluyen la Taupatía y los cambios transcripcionales.

Durante el estudio se utilizaron animales 3xTg-AD de 15 meses de edad, los cuales de acuerdo con la cronología patológica del modelo, presentan acumulación de placas amiloides, ovillos neurofibrilares, pérdida de potenciación a largo plazo (LTP) y aumento de gliosis, entre otros cambios (Oddo, S., 2003; Belfiore, R., 2019), haciendo de este un modelo idóneo para la investigación de los efectos farmacológicos de moléculas o sustancias para la EA.

Se realizó análisis comportamental usando el laberinto acuático de Morris para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la memoria y el aprendizaje (Vorhees, C., 2006). Se evidenció que el extracto en animales 3xTg-AD produjo latencias de escape a la plataforma con una tendencia a la reducción durante los primeros cuatro ensayos, similar a los animales WT(Veh), sin embargo, estos tiempos aumentaron desde el ensayo 5 hasta al 10 se igualaron con los de animales 3xTg-AD(Veh), sin observar diferencias entre los grupos 3xTg-AD(Veh) y 3xTg-AD(Nr). El efecto observado se atribuyó a un posible efecto Wash out o de lavado del extracto, debido a que la administración del extracto finalizó un día previo al inicio de la prueba de comportamiento. Con el objetivo de obtener información de cambios no detectados mediante las latencias durante la prueba de aprendizaje, realizamos un análisis de las estrategias de búsqueda espacial de nado (Van der Jeugd, 2018). Este análisis permite asociar el desempeño cognitivo en los animales con las estrategias utilizadas por los animales en la prueba. Se observó nuevamente que los animales 3xTg-AD tratados con el extracto usaron estrategias de navegación dependientes del hipocampo durante los primeros 4 ensayos, sin embargo, esta mejoría no se consolidó en los ensayos restantes, sugiriendo un efecto Wash-out que debe evaluarse con mayor profundidad.

Durante los sacrificios de los animales, se observó que durante el tratamiento ningún animal murió previo al sacrificio, no se presentaron alteraciones en órganos visibles en órganos ni masas intraperitoneales. Los órganos fueron almacenados y se encuentran en espera de análisis patológico.

En el caso de los animales 3xTg-AD tratados con el agonista sintético GW3965 se observó mejoría cognitiva durante las pruebas de aprendizaje y memoria, estos resultados

concuerdan con lo reportado previamente para los tratamientos con esta misma dosis en modelos APP/PS y 3xTg-AD. Los cambios cognitivos han sido previamente asociados con la reducción de la carga amiloide (Donkin JJ,2010, Suon, S., 2010), o la reducción de la astrogliosis, el rescate de la plasticidad sináptica, mejoría de la desmielinización y recuperación del número de células madre neuronales (Sandoval- Hernández, 2015), en el presente trabajo por motivos de la pandemia, no logramos caracterizar los efectos sobre las placas amiloides, la astrogliosis, la neuroinflamación y la vasculatura cerebral en los animales 3xTg-AD(GW), sin embargo estos se plantearán para próximos trabajos de grado, particularmente, los cambios moleculares asociados a la patología amiloide.

Segundo, se evaluó el efecto de los tratamientos sobre los marcadores histopatológicos de la enfermedad. No se observaron cambios para el antígeno 6E10 en cortes histológicos evaluados por microscopía confocal para los animales 3xTg-AD(Nr), los resultados concuerdan con lo reportado previamente usando el agonista sintético de LXR en el modelo 3xTg-AD (Sandoval- Hernández, 2015). Se observó el aumento de la expresión de ApoE sin modificaciones en la carga amiloide en el hipocampo y corteza en el modelo. Este resultado concuerda también con el estudio desarrollado en el grupo de investigación en el que se administró el agonista de RXR bexaroteno a animales 3xTg-AD, los cuales mostraron una mejoría cognitiva y un aumento de la expresión de ApoE sin reducción de la carga amiloide (Muñoz-Cabrera, J.M., 2019). Posiblemente no se logró un nivel suficiente de lipoproteínas para facilitar el catabolismo de A $\beta$  resultados que deberán ser evaluados en futuros trabajos, sin embargo a pesar de no observar cambios en la reducción de la carga amiloide se observó mejoría cognitiva la cual se puede deber a la reducción de especies oligoméricas de A $\beta$  que no fueron evaluadas o simplemente a que los cambios cognitivos se producen de manera independiente de la reducción de la carga amiloide.

Respecto a los ovillos neurofibrilares, observamos reducción significativa en animales 3xTg-AD tratados con el extracto de *N. reticulata* para el antígeno AT8 mediante microscopía confocal. Los cambios observados en la fosforilación de Tau se asociaron al incremento de ApoE en las mismas regiones. Se describió previamente por Hyang-Sook Hoe *et al.*, (2006) que un cultivo primario de neuronas corticales expuestas a péptidos de ApoE, mostró una reducción de la fosforilación de Tau entre un 70-90% respecto a controles, usando una batería de anticuerpos como AT8, AT270 (p-Tau Thr171) y PS396 (p-Tau Ser396). Aunque

la función de ApoE en la regulación de la fosforilación de Tau está aún en estudio, se sugirió que ApoE induce el crecimiento de neuritas en respuesta al daño, como un posible mecanismo de eliminación de membranas dañadas (Hoe, HS. 2006). Adicionalmente, un estudio previo demostró que ratones de 3 meses deficientes de ApoE presentan niveles elevados de Tau hiperfosforilado en comparación con los controles (Genis, I.,1995), en conjunto estos datos sugieren que los incrementos de ApoE regulan la fosforilación de Tau o sus efectos lesivos en el modelo explicando la posible mejoría comportamental.

Estudiamos el efecto del extracto sobre la actividad inhibidora o reguladora de la fosforilación de Tau, a partir de la regulación de sus quinasas. El género *Nectandra* presenta una abundante riqueza en metabolitos secundarios tales como; alcaloides, lignanos, sesquiterpenos y flavonoides (Macías-Villamizar, 2015). Se ha reportado previamente que un lignano de la *Schisandra* denominado “Schisantherin A”, probado en animales C57BL/6 inyectados con  $A\beta_{1-42}$  de forma intracerebroventricular, disminuye significativamente la fosforilación de Tau, efecto atribuido a la regulación la quinasa GSK3 $\beta$  (Jing, S.; 2020). Adicionalmente, un estudio con células SH5YSY en presencia del péptido  $A\beta_{25-35}$ , y tratadas con *Justicidina A* (un lignano extraído de la planta *Justicia procumbens*), se observó reducción de los niveles de Tau hiperfosforilado, asociado a la reducción de la activación en GSK3 $\beta$  y AMPK (Gu, M.Y., 2016). La actividad inhibidora de la fosforilación de Tau de compuestos derivados de especies vegetales como los mencionados previamente, sugiere el extracto de *Nectandra reticulata* podría contener moléculas similares capaces de inhibir la actividad enzimática de las quinasas de Tau y así reducir la fosforilación de la proteína como se observó en este estudio. En este sentido, la caracterización molecular del extracto que se esta desarrollando actualmente es necesaria para identificar los compuestos que podrían estar teniendo este efecto.

Observamos que el extracto de *N. reticulata* incrementa aproximadamente 4 veces los niveles de expresión de la proteína ApoE en animales 3xTg-AD(Nr) comparados con animales 3xTg-AD(Veh), el receptor nuclear LXR está involucrado en la regulación transcripcional del gen de ApoE , este incremento es comparable al de moléculas agonistas como GW3965 (Suon, S., 2010; Donkin, J.J., 2010; Sandoval- Hernández, 2015) y T091317 (Koldamova, R. P ; Vanmierlo, T.,2010). Adicionalmente, nos permite afirmar que existe una alta probabilidad de que moléculas agonistas naturales del extracto cruzan la Barrera Hematoencéfalica (BHE) y activan la función transcripcional de LXR en el cerebro.

Por otra parte no evidenciamos el aumento de ApoE en los animales 3xTg-AD tratados con el agonista GW3965, la diferencia con respecto a los resultados previamente encontrados podrían deberse a cambios en la solución vehículo utilizada (propilenglicol 20%), que modificaría las propiedades farmacocinéticas en comparación con el DMSO utilizado en estudios anteriores. Sin embargo, la mejoría cognitiva en los animales 3xTg-AD(GW) puede relacionarse con la expresión diferencial de genes observada en el análisis ontológico de los datos del RNAseq que reveló cambios en la expresión de genes asociados la proyección celular, motilidad retrograda, componentes integrales de la membrana plasmática, la sinapsis, memoria, aprendizaje y regulación de la autofagia.

Tercero, se evaluó el proceso inflamatorio mediante el análisis de la microgliosis y la astrogliosis. Se observó que el tratamiento con el extracto de *N. reticula* reduce de manera estadísticamente significativa la astrogliosis en el hipocampo, estos resultados concuerdan con el efecto de los agonistas sintéticos de LXR sobre la activación de la astrogliosis (Liang, Y., 2004; Kang, J., 2012; Sodhi, R. K., 2013, Sandoval-Hernandez, A-G., 2015). Algunos receptores nucleares de la clase I y de la clase II se caracterizan por su capacidad de reprimir la expresión génica a partir de mecanismos independientes de la unión al ADN, dentro de ellos el LXR regula la expresión de genes usando mecanismos de transrepresión al inhibir la activación de la transcripción dependiente del factor nuclear kB (NF-kB), AP-1 o STAT, efecto dependiente del ligando (Thomas, D.; 2018). Los mecanismos de transrepresión mediados por la activación de LXR regulan negativamente la expresión de COX2, MCP1 e iNos en modelos murinos (Zelcer, N., 2011). Los resultados obtenidos con el extracto de *N. reticulata* sugieren nuevamente que las moléculas agonistas de LXR está cruzando la BHE y regulando la expresión génica en este caso proinflamatoria, sin embargo, teniendo en cuenta complejidad de los extractos crudos, no se descarta que el extracto tenga moléculas antiinflamatorios que medien sus efectos a través de otros mecanismos moleculares, lo cual requiere de posteriores estudios.

Cuarto, una hipótesis que ha tomado fuerza en la fisiopatología de la EA esta relacionada con las lesiones vasculares y la pérdida de la integridad de la BHE, las cuales estarían involucradas en el desarrollo de la patología desde el inicio y la progresión de la EA. En el presente estudio no se encontraron cambios en el marcaje para microvasculatura cerebral en los animales 3xTg-AD(Nr), a diferencia de lo observado previamente por Sandoval-

Hernandez (2016) usando el agonista GW3965 (Sandoval-Hernández, A. G, 2016; Sandoval-Hernández, A. G,2015).

Por su parte, el agonista GW3965 produjo un incremento de la expresión de una especie de Tau endógeno de bajo peso molecular sin reducir los niveles de Tau fosforilado, este efecto no ha sido reportado previamente. Sin embargo la relación entre la expresión del transgén humano de Tau y el endógeno podría ser importante en el modelo, Baglietto-Vargas, D. (2014) observó en animales 3xTg-AD que el silenciamiento de Tau endógeno o murino produce menor fosforilación del transgén de Tau respecto a los controles, sin observar alternaciones cognitivas adicionales (Baglietto-Vargas, D.; 2014). Por otra parte, se ha descrito que los agonistas de LXR en cultivo primario de neuronas hipocampales bajo efecto de  $\alpha\beta$ , regulan la expresión de ROCKII (Báez-Becerra, C., 2018) indicando que los agonistas de LXR están implicados en la regulación de la expresión de proteínas asociadas con la formación de microtúbulos y crecimiento dendrítico, incluyendo la expresión de Tau, posiblemente como un mecanismo regeneración que incluirían los genes expresados diferencial a la alza en los animales 3xTg-AD(GW) como *Dynlrb2*, *Dnali1*, *Ttll6* y *Sntn* los cuales podrían estar asociados a la mejoría cognitiva.

Quinto, evaluamos los potenciales mecanismos implicados en la regulación de la fosforilación de Tau observada previamente en los tratamientos con el extracto. Se evaluó la expresión y activación de las quinasas CDK5 y GSK3 $\beta$ . El incremento de la expresión de CDK5 ha sido ampliamente relacionado con la hiperfosforilación de Tau y la subsiguiente formación de ovillos neurofibrilares. Adicionalmente, CDK5 regula parcialmente a GSK3 $\beta$  y la proteína fosfatasa 1 y 2A (PP1 y PP2A). Razón por lo cual, CDK5 es de gran interés como diana farmacológica en la EA (Castro-Alvarez, J. F.; 2015). En el presente trabajo no se observaron cambios significativos en la expresión de CDK5 en el hipocampo de animales tratados con el extracto o con el agonista GW3965 en animales 3xTg-AD respecto a los animales 3xTg-AD(Veh). No se observaron cambios en la expresión de p35 en el hipocampo, sin embargo se observó que el extracto reduce los niveles de p25 en animales 3xTg-AD con respecto a los controles, explicando parcialmente el resultado observado para el marcador AT8. Se ha descrito que la disminución en los niveles de p25 se debe a la modulación de la escisión proteolítica de p35 mediada por calpains (Taniguchi, S.; 2001) las cuales no se evaluaron y requieren de posteriores estudios. La modulación proteolítica de p35 se altera por la presencia de lesiones neurotóxicas observadas en la EA, incluye la

acumulación del péptido amiloide, la excitotoxicidad y el estrés oxidativo que son capaces de interrumpir la homeostasis del calcio intracelular en las neuronas, activando de forma aberrante la calpaína (Lee, M.; 2000). La calpaína es un cisteína proteasa citoplasmática dependiente de  $Ca^{2+}$ , una proenzima citoplasmática que es activada en su dominio N-terminal y traslocada a la membrana (Hisanaga, S.;2003), su activación conduce a la conversión de p35 en p25, donde p25 carece de la señal de anclaje de membrana y presenta un tiempo vida media más larga en comparación con p35, dando como resultado una activación constitutiva y mala localización del complejo CDK5/p25 en el citoplasma y el núcleo (Lee, M.; 2000). La calpastatina (CAST) un inhibidor de la calpaína se encuentra disminuida en los pacientes con EA. Sato *et al* (2011), demostró que ratones Knock-down de la CAST aumentaban la escisión de p35 a p25, mientras que la sobre expresión de CAST en los ratones inhibía la formación de p25, sugiriendo a CAST como un inhibidor de la calpaína con efectos sobre la producción de p25 y la desregulación de CDK5. (Sato, K.; 2011). Estos resultados indicarían que el extracto de *N. reticulata* tiene efectos reguladores de la activación de la calpaína, se ha descrito que el extracto de *N reticulata* presenta un efecto antioxidante *in vitro* que podría estar implicado y así mismo no se descarta la presencia de moléculas inhibidores o que tengan otros mecanismos reguladores del clivaje de p35 directos o indirectos que deberán ser estudiados posteriormente.

Adicionalmente, observamos cambios en la evaluación de la expresión y activación de GSK3 $\beta$  frente al tratamiento con *N. reticulata* y GW3965. GSK3 $\beta$  está involucrada en el deterioro de la memoria, la hiperfosforilación de Tau, el aumento de la producción de  $\beta$ -amiloide y la respuesta inflamatoria asociada a la placa microglial (Hooper C, 2008). La activación de GSK3 $\beta$  requiere de la fosforilación en Tyr216, la cual sucede en un bucle de autofosforilación o por tirosina quinasas de la familia Scr (Hughes, K., 1993; Goc, A., 2014). La fosforilación en Tyr216 es constitutivamente activa y es inactivada por la fosfofosforilación en Ser9 por quinasas como PKA, PKB, p90RSK y Akt, lo que reduce la afinidad de unión por los sustratos de la quinasa (Krishnankutty, A., 2017). Por su parte, la reducción de la fosforilación en Y216 en GSK3 $\beta$  observada tras los tratamientos con GW3965 y el extracto de *Nectandra reticulata* sugiere que la activación de LXR inactiva GSK3 $\beta$ . Estas vías de señalización deben evaluarse con mayor profundidad. En conjunto, los datos indican que el efecto sobre la hiperfosforilación de Tau producido por el extracto de *N. reticulata* se debe a la disminución de la escisión proteolítica de p35 a p25 y la reducción de la actividad de GSK3 $\beta$ .



Sexto, el análisis de expresión génica evidenció la expresión diferencial de 3 genes en los animales 3xTg-AD(Nr) en comparación con los animales 3xTg-AD(Veh). Estos genes regulados a la alza son *Apold1*, *Fabp7* y *Gem*. *Apold1* es un gen que codifica para la proteína APOLD1, esta involucrada en el proceso de angiogénesis, desempeña un papel en los cambios dependientes de la actividad de la vasculatura cerebral que podrían estar involucrados con la función de la BHE (Regard, J.B; 2004), este gen no presentó cambios con el tratamiento del agonista GW3965. Adicionalmente, el análisis de GO indica que esta proteína esta relacionada con procesos de unión a lípidos. Navarro J.F *et al* (2020) indicó que los animales 3xTg-AD presentan una menor expresión de este gen en las capas externas del bulbo olfatorio en comparación con los animales WT, la baja expresión de este gen con función en el metabolismo de lípidos puede alterar el procesamiento de la información del olor que se proyecta en las neuronas receptoras olfativas en la cavidad nasal, lo que se relacionaría con la disfunción olfativa en la EA (Navarro J.F.;2020).

Nuestro análisis reveló que *Fabp7* esta regulado a la alta en los animales 3xTg-AD(Nr), este es un gen que codifica proteína citoplásmica pequeña FABP7 (proteína de unión a ácidos grasos 7), la cual es altamente conservada y se une a ácidos grasos de cadena larga y otros ligandos hidrófobos, esta proteína desempeña un papel importante en el establecimiento de la fibra glial radial en el cerebro en desarrollo, teniendo efecto sobre la migración de neuronas inmaduras en el establecimiento de capas corticales (Shimizu, F.; 1997). Un estudio con ratas jóvenes demostró que los astrocitos positivos para FABP7 se encontraban en mayor proporción en la circonvolución dentada del hipocampo y se colocalizaban con células positivas para el anticuerpo contra la proteína Ki67 (marcador de células recién nacidas). Estos datos sugieren que acumulaciones regionales de astrocitos FABP7 positivos pueden representar depósitos de células que tienen potencial para la neurogénesis (Young, J. K.; 2013) . Este gen es regulado a la alza para los tratamientos de *Nectandra reticulata* y GW3965 en comparación con los animales 3xTg-AD(Veh), lo que sugeriría que ambos tratamientos estarían teniendo un efecto sobre la neurogénesis mediante el incremento de la expresión del gen *Fabp7*.

Por otro lado, *Gem* es un gen que codifica para la proteína GEM (proteína de unión a GTP sobreexpresada en el músculo esquelético), asociado con la cara interna de la membrana plasmática y desempeña un papel como proteína reguladora en la transducción de señales

mediada por receptores (Opatowsky, Y.; 2016). GEM inhibe la reorganización citoesquelética mediada por Rho quinasa, como la formación de fibras de estrés y la retracción de neuritas (Ward, Y., 2004), función relacionada con la morfología celular modulada por la región de unión a microtúbulos de Tau, sugiriendo la posibilidad de que Tau pueda existir corriente arriba en la vía de transducción de señales mediada por Gem GTPasa (Oyama, F.; 2004).

El análisis de expresión génica también determinó la expresión diferencial de 162 genes en los animales 3xTg-AD tratados con GW3965 en comparación con los animales 3xTg-AD(Veh), el análisis funcional determinó que de los 91 genes expresados a la alta entre los que se destacan genes como *Isl1*, *Cav1*, *Dynlrb2*, *Dnali1*, *Rpl30*. Dentro de estos genes es importante *Cav1* ya que codifica para la proteína Caveolina 1 esencial para la formación de caveolas y por lo tanto balsas lipídicas no lineales que mantienen y estabilizan la señalización sináptica adecuada (Head, B. P., 2010). Adicionalmente, *Dynlrb2* codifica para la dineína de cadena ligera de control tipo 2, componente accesorio no catalítico del complejo citoplasmático de dineína involucrado en la regulación de la motilidad retrógrada intracelular de vesículas y orgánulos a lo largo de los microtúbulos (Susalka, S. J; 2002) aspectos que ya fueron descritos previamente.

Adicionalmente, el gen *Prl* que codifica para la proteína Prolactina (PRL) y que se encontró con la mayor magnitud de cambio a la alza en los animales 3xTg-AD(GW) ha sido relacionado recientemente con funciones antiinflamatorias al prevenir la secreción de citoquinas inhibiendo NF- $\kappa$ B, lo que da como resultado una secreción reducida de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (Olmos- Ortiz, 2019), también se ha observado que PRL es capaz de disminuir la peroxidación lipídica en las neuronas del hipocampo expuestas a la excitotoxicidad del glutamato (Glu) ( Rivero-Segura N.A, 2019) y aumentar la secreción de IL-10 e IL-4 en el hipocampo de ratas (Reyes-Mendoza y Morales, T., 2020), este resultado sugeriría que el efecto antiinflamatorio del agonista GW3965 observado en estudios anteriores podría estar relacionado con la expresión a la alza del gen *Prl*.

En cuanto a los genes expresados a la baja en los animales 3xTg-AD(GW) se encontraron genes como *Grik3*, *Chrm4*, *Uba6*, *Oprm1*, *Hs6st3*, *Egr1*, *Cntnap4*, *Syt2*. Entre estos genes se destacan *Uba6* que codifica para la enzima activadora de ubiquitina, un regulador negativo de la autofagia, su regulación a la baja podría mejorar el aclaramiento autofágico

de agregados de proteínas en trastornos neurodegenerativos (Jia, R., & Bonifacino, J. S.,2019). Por otro lado, la metilación del receptor opioide Kappa 1 (OPRM1) se ha asociado ampliamente con la EA, su función se ha relacionado con receptor de ligandos endógenos y actualmente su metilación puede ser considerado como un biomarcador para la EA (Xu, C.,2018).

Recientemente se ha observado que la sobreexpresión de Egr-1 en neuronas primarias del hipocampo de rata induce la expresión y activación de BACE-1 lo que promueve el procesamiento de la APP amiloidogénica y mejora la síntesis de A $\beta$ . Adicionalmente, se observó que en neuronas primarias del hipocampo de ratón, la eliminación de BACE-1 bloquea casi por completo el procesamiento de APP amiloidogénico inducido por Egr-1 y la síntesis de A $\beta$  (Qin, X., 2016). Adicionalmente, se ha reportado que eliminación de Caspr4 (proteína codificada por el gen *Cntnap4*) en ratones embrionarios en día 14 mejora la proliferación de células progenitoras neuronales derivados de la zona subventricular (SVZ), una región neurogénica en la corteza en desarrollo (Yin, F.T, 2015).

Otro gen regulado a la baja en los animales 3xTg-AD(GW) respecto a los animales 3xTg-AD(Veh) y que codifica la proteína Sinaptotagmina II, es el gen *Syt2* del cual no se ha estudiado su relación con la EA o las enfermedades neurodegenerativas, sin embargo, esta proteína tiene alta homología con la Sinaptotagmina I. La Sinaptotagmina I es una proteína de la vesícula presináptica requerida para la regulación de la transmisión sináptica y para mantener la función cognitiva, esta proteína se ha visto aumentada en el líquido cefalorraquídeo en pacientes con EA y puede ser considerado como un biomarcador para la enfermedad (Öhrfelt, A.,2016). Estos datos sugieren que la regulación a la baja de estos genes estaría relacionado con la mejora cognitiva observada en los animales 3xTg-AD(GW) al tener funciones relacionadas con la sinapsis, la memoria y el aprendizaje de acuerdo con el análisis ontológico realizado.

En conjunto los datos del presente trabajo sugieren que el tratamiento con el extracto de *Nectandra reticulata* promueve cambios moleculares asociados a la hiperfosforilación de Tau, la astrogliosis, el aumento de la expresión de ApoE y la expresión de genes asociados al metabolismo de lípidos y la angiogénesis, sin cambios detectables en el comportamiento. Estos cambios moleculares sugieren un efecto terapéutico potencial sobre la patología de la EA, que en dosis superiores podría evidenciar cambios comportamentales. Por su parte,

el tratamiento con el agonista GW3965 promovió cambios moleculares asociados a la expresión Tau, la expresión y activación de GSK3 $\beta$ , así como la expresión diferencial de genes asociados al componente integral de la membrana plasmática y fosfoproteínas, cambios moleculares que no se han descrito previamente.

## Capítulo 10. Conclusiones

Se describió el efecto de un extracto etanólico crudo de hojas de *Nectandra reticulata* sobre los principales marcadores fisiopatológicos de la Enfermedad de Alzheimer dada su actividad agonista de LXRs, con potencial uso terapéutico en el modelo animal 3xTg-AD. Además, se evaluaron cambios patológicos asociados efecto del extracto, y del agonista GW3965.

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que:

1. La administración del extracto no se asoció con una mejoría cognitiva en un tratamiento de 12 semanas de duración con la dosis de 25 mg/kg/día. El tratamiento con GW3965 revirtió el deterioro cognitivo efecto de la dosis de 33 mg/kg/día.
2. La administración del extracto redujo el marcaje la fosforilación de Tau, marcador histopatológico de la EA sin producir cambios cognitivos.
3. La administración del extracto redujo la astrogliosis.
4. La administración del extracto incrementó el nivel de expresión ApoE, un blanco transcripcional de LXRs, sugiriendo que los agonistas de LXR en el extracto cruzan la BHE
5. La administración del extracto se asoció con la reducción de la escisión proteolítica de p35 a 25, regulador de CDK5 y redujo la fosforilación de GSK3 $\beta$  implicadas en la fosforilación de Tau.
6. La administración del agonista GW3965 se asoció con la reducción de la escisión proteolítica de p35 a 25 en animales WT y la reducción en fosforilación de GSK3 $\beta$  en los animales 3xTg-AD.

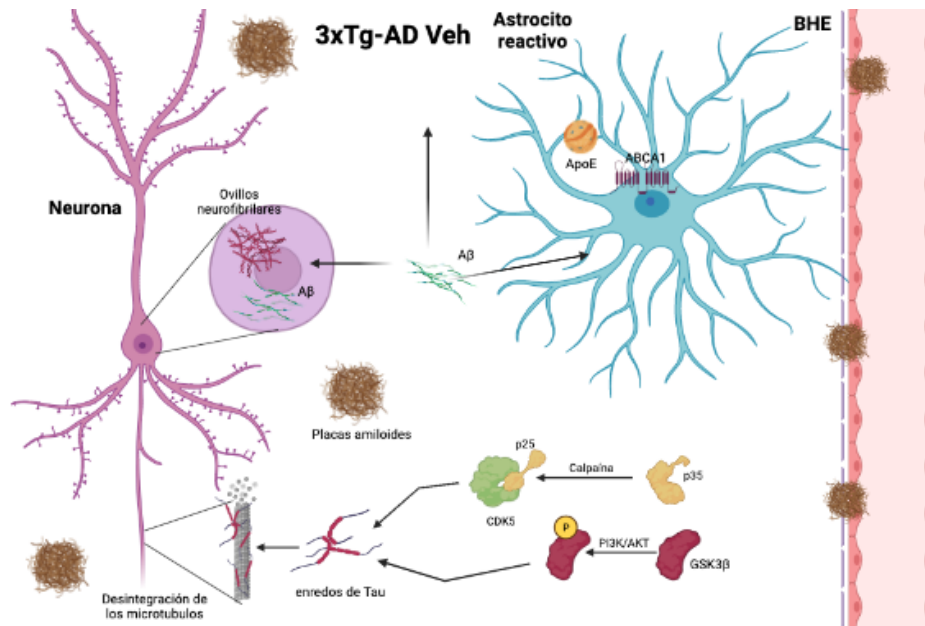
**Figura 10-1: Modelo explicativo de (A) los animales 3xTg-AD(Veh) y de los cambios moleculares efecto del tratamiento con (B) Extracto de *Nectandra reticulata* (25 mg/kg/día) y (C) GW3965 (33 mg/kg/día) en el modelo murino 3xTg-AD envejecido.**

El extracto de *Nectandra reticulata* en una dosis de 25 mg/Kg/día aumenta la expresión de ApoE, disminuyendo la astrogliosis, disminuyendo la hiperfosforilación de Tau a través de la regulación de la proteólisis de p35 a p25 y la inhibición de la fosforilación de GSK3 $\beta$  en

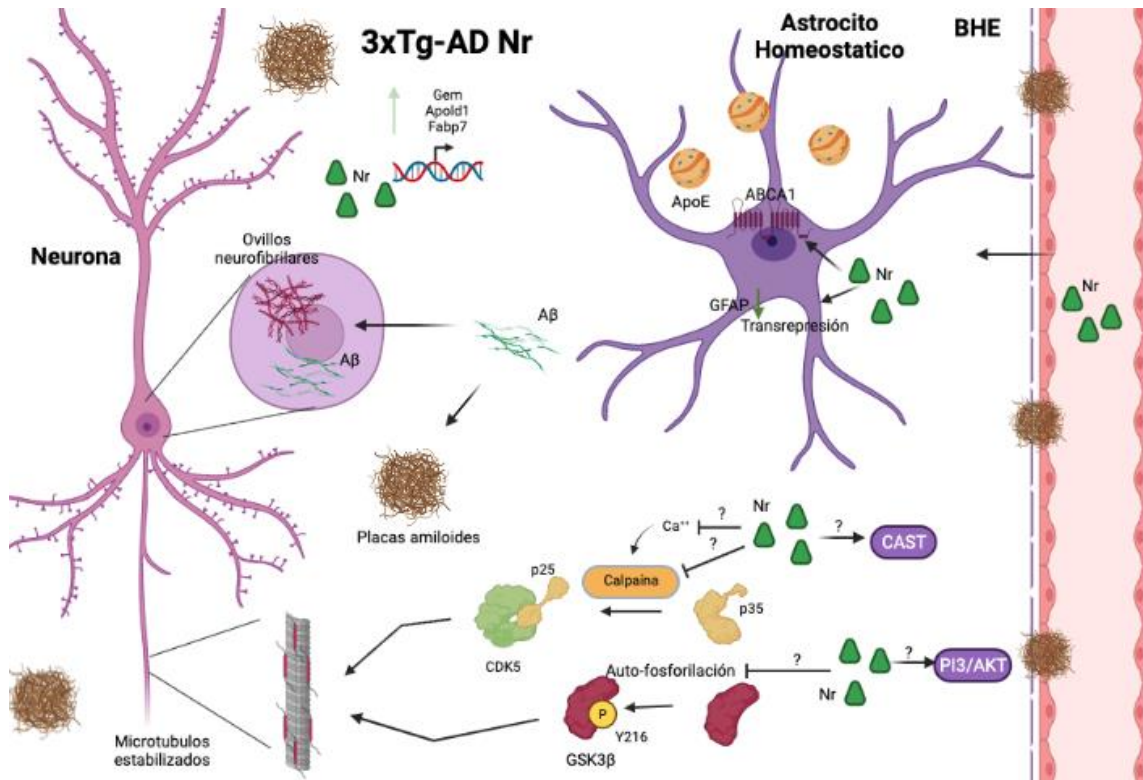
Y216. Adicionalmente, el extracto regula la expresión positiva de los genes *Apold1*, *Fabp7* y *Gem*, sin observarse un efecto sobre la cognición.

Por su parte, el agonista sintético de LXR GW3965 regula la expresión de múltiples genes asociados a diferentes procesos celulares relacionados con la neuroinflamación, la integridad de la membrana plasmática, la motilidad retrograda intracelular, la autofagia, la sinapsis, la memoria y el aprendizaje. Adicionalmente, GW3965 modula la activación de GSK3 $\beta$  al inhibir su fosforilación en Y216, estos cambios de expresión génica y postraduccionales estarían relacionados con la mejora cognitiva observada en los animales 3xTg-AD(GW)

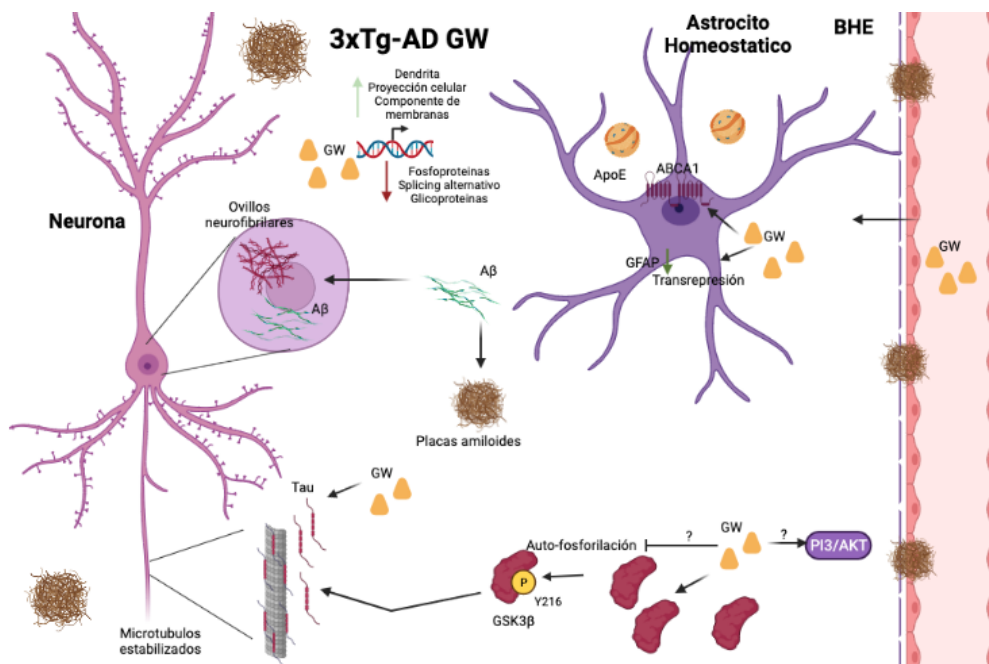
A.



B.



C.



# Capítulo 11. Recomendaciones

En el desarrollo de este estudio, durante el tratamiento con *N. reticulata* y GW3965 no murieron animales producto del tratamiento, tampoco se observaron cambios físicos relacionados con el suministro del extracto y el agonista. De acuerdo con esto, se recolectaron hígados y páncreas con el propósito de desarrollar futuros ensayos de seguridad relacionados con la dosis y el tiempo del tratamiento .

Las perspectivas de este trabajo incluyen:

Evaluar el efecto de fracciones del extracto sobre los marcadores fisiopatológicos de la EA como posible blanco terapéutico.

Realizar análisis electrofisiológicos para determinar los efectos del extracto en la sinapsis.

Evaluar el efecto protector del extracto sobre las espinas dendríticas en un contexto de EA frente a los agentes tóxicos de cada patología (oA $\beta$ 42 y Tau).

Evaluar el efecto de la fosforilación de Tau en el modelo SH5YSY diferenciado y tratado con ácido okadaico.

Evaluar el efecto del extracto y GW3965 sobre la activación de la calpaina en el modelo 3xTg-AD



## Capítulo 12. Fuentes de financiamiento

Esta tesis fue financiada mediante un proyecto avalado por Colciencias en la convocatoria de Salud de 2018. Evaluación de los mecanismos moleculares asociados a la activación farmacológica de LXR en modelos de la enfermedad de Alzheimer y del potencial terapéutico de un extracto de *Nectandra reticulata* (*Lauraceae*). Número de convocatoria 807-2018. Número de contrato 727-2018.

# Bibliografía

- Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J., Cole, G. M., Cooper, N. R., Eikelenboom, P., Emmerling, M., Fiebich, B. L., Finch, C. E., Frautschy, S., Griffin, W. S., Hampel, H., Hull, M., Landreth, G., Lue, L., Mrak, R., Mackenzie, I. R., McGeer, P. L., ... Wyss-Coray, T. (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 21(3), 383–421. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(00\)00124-x](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(00)00124-x)
- Alonso, A. D., Cohen, L. S., Corbo, C., Morozova, V., Elidrissi, A., Phillips, G., & Kleiman, F. E. (2018). Hyperphosphorylation of Tau Associates With Changes in Its Function Beyond Microtubule Stability. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 338. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00338>
- Allnutt, A. B., Waters, A. K., Kesari, S., & Yenugonda, V. M. (2020). Physiological and pathological roles of Cdk5: potential directions for therapeutic targeting in neurodegenerative disease. *ACS Chemical Neuroscience*. doi:10.1021/acschemneuro.0c00096
- Alzheimer's Disease International, 2021 ALZHEIMER ' S DISEASE FACTS AND Includes a Special Report on Alzheimer ' s Detection in the Primary Care Setting : Connecting Patients.
- American Psychiatric Association. 1995. DSM-IV Manual Diagnóstico y Estadístico de Las Enfermedades Mentales.
- Avila, J., & Hernández, F. (2007). GSK-3 inhibitors for Alzheimer's disease. *Expert review of neurotherapeutics*, 7(11), 1527–1533. <https://doi.org/10.1586/14737175.7.11.1527>
- Ayaz, M., Ullah, F., Sadiq, A., Kim, M. O., & Ali, T. (2019). Editorial: Natural Products-Based Drugs: Potential Therapeutics Against Alzheimer's Disease and Other Neurological Disorders. *Frontiers in Pharmacology*, 10. doi:10.3389/fphar.2019.01417
- Bartus RT, Dean RL 3rd, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*. 1982;217(4558):408-414. doi:10.1126/science.7046051
- Bartus RT. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp Neurol*. 2000;163(2):495-529. doi:10.1006/exnr.2000.7397
- Bayer, T., Cappai, R., Masters, C. et al. It all sticks together—the APP-related family of proteins and Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* 4, 524–528 (1999). <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000552>
- Belorusova, A.Y., Evertsson, E., Hovdal, D. et al. Structural analysis identifies an escape route from the adverse lipogenic effects of liver X receptor ligands. *Commun Biol* 2, 431 (2019). <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0675-0>
- Bertram, L., & Tanzi, R. E. (2009). Genome-wide association studies in Alzheimer's disease. *Human molecular genetics*, 18(R2), R137–R145. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp406>
- Billings, Lauren M, Salvatore Oddo, Kim N Green, James L Mcgaugh, and Frank M Laferla. 2005. "Intraneuronal A $\beta$  Causes the Onset of Early Alzheimer ' s Disease- Related Cognitive Deficits in Transgenic Mice" 45: 675–88. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.040>.
- Bondi, M. W., Edmonds, E. C., & Salmon, D. P. . Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future. *Journal of the International Neuropsychological Society*. 2017; 23(9-10), 818– 831. doi:10.1017/s135561771700100x
- Braak H, Braak E, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Occurrence of neuropil threads in the senile human brain and in Alzheimer's disease: a third location of paired helical filaments outside

- Braak H., Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991;82:239–259. doi: 10.1007/BF00308809.
- Briggs, R., Kennelly, S. P., & O'Neill, D. (2016). Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clinical medicine (London, England)*, 16(3), 247–253. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.16-3-247>
- Camins A, Verdaguer E, Folch J, Canudas AM, Pallàs M. The role of CDK5/P25 formation/inhibition in neurodegeneration. *Drug News Perspect.* 2006;19(8):453-460. doi:10.1358/dnp.2006.19.8.1043961
- Castro-Alvarez, J. F., Uribe-Arias, S. A., Kosik, K. S., & Cardona-Gómez, G. P. (2014). Long- and short-term CDK5 knockdown prevents spatial memory dysfunction and tau pathology of triple transgenic Alzheimer's mice. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6. doi:10.3389/fnagi.2014.00243
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L., & Pericak-Vance, M. A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science (New York, N.Y.)*, 261(5123), 921–923. <https://doi.org/10.1126/science.8346443>
- Crews, L., Patrick, C., Adame, A. et al. La modulación de la señalización aberrante de CDK5 rescata la neurogénesis alterada en modelos de la enfermedad de Alzheimer. *Cell Death Dis* 2, e120 (2011). <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.2>
- Cruz, J. C., Tseng, H.-C., Goldman, J. A., Shih, H., & Tsai, L.-H. Aberrant Cdk5 Activation by p25 Triggers Pathological Events Leading to Neurodegeneration and Neurofibrillary Tangles. *Neuron*, 40. 3003; (3), 471–483. doi:10.1016/s0896-6273(03)00627-5
- Cruchaga, C., Kauwe, J. S., Harari, O., Jin, S. C., Cai, Y., Karch, C. M., Benitez, B. A., Jeng, A. T., Skorupa, T., Carrell, D., Bertelsen, S., Bailey, M., McKean, D., Shulman, J. M., De Jager, P. L., Chibnik, L., Bennett, D. A., Arnold, S. E., Harold, D., Sims, R., ... Goate, A. M. (2013). GWAS of cerebrospinal fluid tau levels identifies risk variants for Alzheimer's disease. *Neuron*, 78(2), 256–268. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.02.026>
- Cummings, J. L. (1992). Neuropsychiatric aspects of Alzheimer's disease and other dementing illnesses. In S. C. Yudofsky & R. E. Hales (Eds.), *American Psychiatric Press textbook of neuropsychiatry* (pp. 605–620). American Psychiatric Association.
- D. W. Huang, B. T. Sherman, R. A. Lempicki, Bioinformatics enrichment tools: Paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 37, 1–13 (2009)
- D. W. Huang, B. T. Sherman, R. A. Lempicki, Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 4, 44–57 (2009).
- Davies, P. and Maloney, A.J. (1976) Selective Loss of Central Cholinergic Neurons in Alzheimer's Disease. *The Lancet*, 2, 1403. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(76\)91936-](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(76)91936-)
- Donkin, J. J., Stukas, S., Hirsch-Reinshagen, V., Namjoshi, D., Wilkinson, A., May, S., Chan, J., Fan, J., Collins, J., & Wellington, C. L. (2010). ATP-binding cassette transporter A1 mediates the beneficial effects of the liver X receptor agonist GW3965 on object recognition memory and amyloid burden in amyloid precursor protein/presenilin 1 mice. *The Journal of biological chemistry*, 285(44), 34144–34154. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.108100>
- Dos Santos Picanco Leide Caroline \*, Priscilla F. Ozela, Maiara de Fatima de Brito Brito, Abraao A. Pinheiro, Elias C. Padilha, Francinaldo S. Braga, Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva, Cleydson Breno Rodrigues dos Santos, Joaquín M.C. Rosa and Lorane Izabel da Silva Hage-

- Melim\*, "Alzheimer's Disease: A Review from the Pathophysiology to Diagnosis, New Perspectives for Pharmacological Treatment", *Current Medicinal Chemistry*. 2018; 25: 3141. <https://doi.org/10.2174/0929867323666161213101126>
- Drachman DA, Leavitt J. Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging?. *Arch Neurol*. 1974;30(2):113-121. doi:10.1001/archneur.1974.00490320001001
- Drachman DA. Memory and cognitive function in man: does the cholinergic system have a specific role?. *Neurology*. 1977;27(8):783-790. doi:10.1212/wnl.27.8.783
- Du, X., Wang, X. & Geng, M. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Transl Neurodegener* 7, 2. 2018. <https://doi.org/10.1186/s40035-018-0107-y>
- Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-Tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y, Yager D, Morgan D, Gordon MN, Holcomb L, Refolo L, Zenk B, Hardy J, Younkin S. Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature*. 1996 Oct 24;383(6602):710-3
- Esther, Ana, Estrada Rodríguez, and Chantal Zomosa. 2017. "Papel de la agregación del péptido beta amiloide en la enfermedad de alzheimer \*" 36 (1): 2–11.
- Engmann, O., & Giese, K. P. (2009). Crosstalk between Cdk5 and GSK3beta: Implications for Alzheimer's Disease. *Frontiers in molecular neuroscience*, 2, 2. <https://doi.org/10.3389/neuro.02.002.2009>
- Evans, R. M., & Mangelsdorf, D. J. (2014). Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell*, 157(1), 255–266. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.012>
- Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA*. 1997;278(16):1349-
- Frost, B., Jacks, R. L., & Diamond, M. I. (2009). Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *The Journal of biological chemistry*, 284(19), 12845–12852. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808759200>
- Fuster-Matanzo, A., Hernández, F. & Ávila, J. Tau spreading mechanisms; implications for dysfunctional tauopathies. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 645 (2018).
- Gauthier, S., Feldman, H. H., Schneider, L. S., Wilcock, G. K., Frisoni, G. B., Hardlund, J. H., Moebius, H. J., Bentham, P., Kook, K. A., Wischik, D. J., Schelter, B. O., Davis, C. S., Staff, R. T., Bracoud, L., Shamsi, K., Storey, J. M., Harrington, C. R., & Wischik, C. M. (2016). Efficacy and safety of tau-aggregation inhibitor therapy in patients with mild or moderate Alzheimer's disease: a randomised, controlled, double-blind, parallel-arm, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*, 388(10062), 2873–2884. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31275-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31275-2)
- Gralle, Matthias, Cristiano L P Oliveira, Luiz H Guerreiro, William J McKinstry, Denise Galatis, Colin L Masters, Roberto Cappai, Michael W Parker, and Carlos H I Ramos. 2006. Solution Conformation and Heparin-Induced Dimerization of the Full-Length Extracellular Domain of the Human Amyloid Precursor Protein, 493–508. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.12.053>.
- Grauer, E., & Kapon, Y. (1993). Wistar-Kyoto rats in the Morris water maze: Impaired working memory and hyper-reactivity to stress. *Behavioural Brain Research*, 59(1-2), 147–151. doi:10.1016/0166-4328(93)90161-i

- Goc, A. et al. Targeting Src-mediated Tyr216 phosphorylation and activation of GSK-3 in prostate cancer cells inhibit prostate cancer progression in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 5, 775–787 (2014).
- Gu, J.L., Liu, F. Tau in Alzheimer's Disease: Pathological Alterations and an Attractive Therapeutic Target. *CURR MED SCI* 40, 1009–1021 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11596-020-2282-1>
- Guo, T., Noble, W. and Hanger, DP. Roles of tau protein in health and disease. *Neuropathological record*. 2017; 133 (5), 665–704. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1707-9>
- Guyon A, Rousseau J, Lamothe G, Tremblay JP (2020) The protective mutation A673T in amyloid precursor protein gene decreases A $\beta$  peptides production for 14 forms of Familial Alzheimer's Disease in SH-SY5Y cells. *PLoS ONE* 15(12): e0237122. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237122>
- Hanger D.P., B.H. Anderton, W. Noble. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease *Trends in Molecular Medicine*. 2009; 15, pp. 112-11
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5580), 353–356. <https://doi.org/10.1126/science.1072994>
- Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P. et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 41, 1088–1093 (2009). <https://doi.org/10.1038/ng.440>
- Hashioka, Sadayuki, Akira Monji, and Tadashi Ueda. 2005. "Amyloid- b Fibril Formation Is Not Necessarily Required for Microglial Activation by the Peptides" 47: 369–76. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2005.05.001>.
- Head, B. P., Peart, J. N., Panneerselvam, M., Yokoyama, T., Pearn, M. L., Niesman, I. R., ... Patel, H. H. (2010). Loss of Caveolin-1 Accelerates Neurodegeneration and Aging. *PLoS ONE*, 5(12), e15697. doi:10.1371/journal.pone.00156
- Høilund-Carlsen, P. F., & Alavi, A. (2021). Aducanumab (Marketed as Aduhelm) Approval Is Likely Based on Misinterpretation of PET Imaging Data. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 10.3233/JAD-215275. Advance online publication. <https://doi.org/10.3233/JAD-215275>
- Holtzman, D. M., Herz, J., & Bu, G. (2012). Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(3), a006312. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006312>
- Honig, L. S., Vellas, B., Woodward, M., Boada, M., Bullock, R., Borrie, M., ... Siemers, E. (2018). Trial of Solanezumab for Mild Dementia Due to Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, 378(4), 321–330. doi:10.1056/nejmoa1705971
- Hoshi M., A. Takashima, K. Noguchi, M. Murayama, M. Sato, S. Kondo, Y. Saitoh, K. Ishiguro, T. Hoshino, K. Imahori. Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93.1996; pp. 2719-2723
- Hughes, K., Nikolakaki, E., Plyte, S. E., Totty, N. F. & Woodgett, J. R. Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *EMBO J*. 12, 803–808 (1993).
- Iqbal, K., Liu, F., Gong, C. X., & Grundke-Iqbal, I. Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Current Alzheimer research*. 2010; 7(8), 656–664. <https://doi.org/10.2174/156720510793611592>

- Jiang, Q., Lee, C. Y., Mandrekar, S., Wilkinson, B., Cramer, P., Zelcer, N., Mann, K., Lamb, B., Willson, T. M., Collins, J. L., Richardson, J. C., Smith, J. D., Comery, T. A., Riddell, D., Holtzman, D. M., Tontonoz, P., & Landreth, G. E. (2008). ApoE promotes the proteolytic degradation of A $\beta$ . *Neuron*, 58(5), 681–693. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.04.010>
- Jia, R., & Bonifacino, J. S. (2019). Negative regulation of autophagy by UBA6-BIRC6-mediated ubiquitination of LC3. *eLife*, 8, e50034. <https://doi.org/10.7554/eLife.50034>
- Karlawish, Jason, Clifford R Jack, Walter A Rocca, Heather M Snyder, and Maria C Carrillo. 2017. Alzheimer ' s Disease : The Next Frontier — Special Report 2017. *Alzheimer's & Dementia*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.02.006>.
- Kim Y.S., Joh T.H. Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp Mol Med*. 2006;38:333–347.
- Kinney, J. W., Bemiller, S. M., Murtishaw, A. S., Leisgang, A. M., Salazar, A. M., & Lamb, B. T. (2018). Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia (New York, N. Y.)*, 4, 575–590. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2018.06.014>
- Kojetin, D., Matta-Camacho, E., Hughes, T. et al. Structural mechanism for signal transduction in RXR nuclear receptor heterodimers. *Nat Commun* 6, 8013 (2015). <https://doi.org/10.1038/ncomms9013>
- Koldamova, Radosveta, Matthias Staufenbiel, and Iliya Lefterov. 2005. "Lack of ABCA1 Considerably Decreases Brain ApoE Level and Increases Amyloid Deposition in APP23 Mice \*\*" 280 (52): 43224–35. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504513200>.
- Komati, R., Spadoni, D., Zheng, S., Sridhar, J., Riley, K. E., & Wang, G. (2017). Ligands of Therapeutic Utility for the Liver X Receptors. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(1), 88. <https://doi.org/10.3390/molecules22010088>
- Korach-André, M., & Gustafsson, J. Å. (2015). Liver X receptors as regulators of metabolism. *Biomolecular concepts*, 6(3), 177–190. <https://doi.org/10.1515/bmc-2015-0007>
- Kosik, Kenneth S, Catharine L Joachim, and Dennis J Selkoe. 1986. "Microtubule- Associated Protein Tau ( T ) Is a Major Antigenic Component of Paired Helical Filaments in Alzheimer Disease" 83 (June): 4044–48.
- Krabbe G., Halle A., Matyash V., Rinnenthal J.L., Eom G.D., Bernhardt U. Functional impairment of microglia coincides with beta-amyloid deposition in mice with Alzheimer-Like pathology. *PLoS One*. 2013;8:e60921
- Krishnankutty, A., Kimura, T., Saito, T. et al. In vivo regulation of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  activity in neurons and brains. *Sci Rep* 7, 8602 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09239->
- Lau, L. F., Seymour, P. A., Sanner, M. A., & Schachter, J. B. (2002). Cdk5 as a drug target for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of molecular neuroscience : MN*, 19(3), 267–273. <https://doi.org/10.1385/JMN:19:3:267>
- Lambert, J. C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O., Zelenika, D., Bullido, M. J., Tavernier, B., Letenneur, L., Bettens, K., Berr, C., Pasquier, F., Fiévet, N., Barberger-Gateau, P., Engelborghs, S., De Deyn, P., Mateo, I., Franck, A., Amouyel, P. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nature genetics*, 41(10), 1094–1099. <https://doi.org/10.1038/ng.439>

- Leroy, K., Ando, K., Héraud, C., Yilmaz, Z., Authelet, M., Boeynaems, J. M., Buée, L., De Decker, R., & Brion, J. P. (2010). Lithium treatment arrests the development of neurofibrillary tangles in mutant tau transgenic mice with advanced neurofibrillary pathology. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 19(2), 705–719. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1276>
- Li, X., Yeh, V., & Molteni, V. (2010). Liver X receptor modulators: a review of recently patented compounds (2007 – 2009). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 20(4), 535–562. doi:10.1517/13543771003621269
- Liang, G.S., Yang, J., Horton, J.D., Hammer, R.E., Goldstein, J.L., & Brown, M.S. (2002). Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 277, No. 11, pp. 9520-9528, ISI:000174400600105
- Liu, PP., Xie, Y., Meng, XY. et al. History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease. *Sig Transduct Target Ther* 4, 29 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0063-8>
- Lund, E. G., Peterson, L. B., Adams, A. D., Lam, M. H., Burton, C. A., Chin, J., Guo, Q., Huang, S., Latham, M., Lopez, J. C., Menke, J. G., Milot, D. P., Mitnaul, L. J., Rex-Rabe, S. E., Rosa, R. L., Tian, J. Y., Wright, S. D., & Sparrow, C. P. (2006). Different roles of liver X receptor alpha and beta in lipid metabolism: effects of an alpha-selective and a dual agonist in mice deficient in each subtype. *Biochemical pharmacology*, 71(4), 453–463. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.11.004>
- Loren, J., Huang, Z., Laffitte, B. A., & Molteni, V. (2013). Liver X receptor modulators: a review of recently patented compounds (2009 - 2012). *Expert opinion on therapeutic patents*, 23(10), 1317–1335. <https://doi.org/10.1517/13543776.2013.814640>
- Macías-Villamizar, V.E., Cuca-Suarez. L.E., Coy-Barrera, E.D. (2015). Genus *Nectandra*: "Phytochemistry and Biological Activity". *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 14 (4): 317 – 342 ISSN 0717 7917
- Mandelkow EM, Mandelkow E. Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2(7):a006247. doi:10.1101/cshperspect.a006247
- Mandrekar-Colucci, S., & Landreth, G. E. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 15(9), 1085–1097. Nuclear receptors as therapeutic targets for Alzheimer's disease. 2011. doi:10.1517/14728222.2011.594043
- Mariani, M. M., Malm, T., Lamb, R., Jay, T. R., Neilson, L., Casali, B., Medarametla, L., & Landreth, G. E. (2017). Neuronally-directed effects of RXR activation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Scientific reports*, 7, 42270. <https://doi.org/10.1038/srep42270>
- Martin, L., Latypova, X., Wilson, C. M., Magnaudeix, A., Perrin, M.-L., Yardin, C., & Terro, F. Tau protein kinases: Involvement in Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*. 2013; 12(1), 289–309. doi:10.1016/j.arr.2012.06.003
- Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, et al. Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science* 2010;330(6012):1774
- Mazaira, G. I., Zgajnar, N. R., Lotufo, C. M., Daneri-Becerra, C., Sivils, J. C., Soto, O. B., Cox, M. B., & Galigniana, M. D. (2018). The Nuclear Receptor Field: A Historical Overview and Future Challenges. *Nuclear receptor research*, 5, 101320. <https://doi.org/10.11131/2018/101320>
- Mitro N., Mak P. A., Vargas L., Godio C., Hampton E., Molteni V., Kreusch A. and Saez E. (2007) The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* 445, 219-223.

- Mohandas, E., Rajmohan, V., & Raghunath, B. (2009). Neurobiology of Alzheimer's disease. *Indian journal of psychiatry*, 51(1), 55–61. <https://doi.org/10.4103/0019-5545.44908>
- Monge-bonilla, Alfredo Sanabria-castro Ileana Alvarado-echeverría Cecilia. 2017. Molecular Pathogenesis of Alzheimer ' s Disease : An Update 10103: 46–54. <https://doi.org/10.1159/000464422>.
- Moreno SR, Arnobio A, De Carvalho JJ, Nascimento L, Oliveira Timoteo M, Olej B, Rocha EK, Pereira M, Bernardo-Filho M, Caldas LQ. 2007. The ingestion of a *Nectandra membranacea* extract changes the bioavailability of technetium-99m radiobiocomplex in rat organs. *Biol Res* 40: 131 - 135.
- Morris R. G., Garrud P., Rawlins J. N. and O'Keefe J. 1982. "Place Navigation Impaired in Rats with Hippocampal Lesions." *Nature* 297: 681–683.
- Mukai F., K. Ishiguro, Y. Sano, S.C. Fujita. Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta. *Journal of Neurochemistry*. 2002; 81 , pp. 1073-1083
- Müller, U., Deller, T. & Korte, M. Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nat Rev Neurosci* 18, 281–298 (2017). <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.29>
- Muñoz-Cabrera, J. M., Sandoval-Hernández, A. G., Niño, A., Báez, T., Bustos-Rangel, A., Cardona-Gómez, G. P., Múnera, A., & Arboleda, G. (2019). Bexarotene therapy ameliorates behavioral deficits and induces functional and molecular changes in very-old Triple Transgenic Mice model of Alzheimer's disease. *PloS one*, 14(10), e0223578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223578>
- Nunes, M. A., Viel, T. A., & Buck, H. S. (2013). Microdose lithium treatment stabilized cognitive impairment in patients with Alzheimer's disease. *Current Alzheimer research*, 10(1), 104–107. <https://doi.org/10.2174/1567205011310010014>
- Oddo, Salvatore, Antonella Caccamo, Jason D Shepherd, M Paul Murphy, Todd E Golde, Rakez Kaye, Raju Metherate, Mark P Mattson, Yama Akbari, and Frank M Laferla. 2003. Triple-Transgenic Model of Alzheimer ' s Disease with Plaques and Tangles: Intracellular A  $\beta$  and Synaptic Dysfunction. 39: 409–21.
- Olmos-Ortiz, A., Déciga-García, M., Preciado-Martínez, E., Bermejo-Martínez, L., Flores-Espinosa, P., Mancilla-Herrera, I., Irlés, C., Helguera-Repetto, A.C., Quesada-Reyna, B., Goffin, V., et al. (2019). Prolactin decreases LPS-induced inflammatory cytokines by inhibiting TLR-4/NFκB signaling in the human placenta. *Mol. Hum. Reprod.* 25: 660–667. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaz038>.
- Oyama, F., Kotliarova, S., Harada, A., Ito, M., Miyazaki, H., Ueyama, Y., ... Ihara, Y. (2004). Gem GTPase and Tau. *Journal of Biological Chemistry*, 279(26), 27272–27277. doi:10.1074/jbc.m401634200
- Öhrfelt, A., Brinkmalm, A., Dumurgier, J. et al. The pre-synaptic vesicle protein synaptotagmin is a novel biomarker for Alzheimer's disease. *Alz Res Therapy* 8, 41 (2016). <https://doi.org/10.1186/s13195-016-0208-8>
- Pagani, L., & Eckert, A. (2011). Amyloid-Beta interaction with mitochondria. *International journal of Alzheimer's disease*, 2011, 925050. <https://doi.org/10.4061/2011/925050>



- Panda, S. S., & Jhanji, N. (2020). Natural Products as Potential Anti-Alzheimer Agents. *Current medicinal chemistry*, 27(35), 5887–5917. <https://doi.org/10.2174/0929867326666190618113613>
- Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C. 2017. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods* 14:417–419. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.4197>, PMID: 28263 959
- Pei J.J., T. Tanaka, Y.C. Tung, E. Braak, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal. Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*.1997; 56 , pp. 70-78
- Perry, E.K., Blessed, G., Tomlinson, B.E., Perry, R.H., Crow, T.J., Cross, A.J., Dockray, G.J., Dimaline, R., and Arregui, A. 1981. Neurochemical activities in human temporal lobe related to aging and Alzheimer-type changes. *Neurobiol. Aging* 2:251 –256
- Plat J., Mensink RP El aumento de la expresión intestinal de ABCA1 contribuye a la disminución de la absorción de colesterol después del consumo de estanol de plantas. *FASEB J.* 2002; 16 : 1248-1253. doi: 10.1096 / fj.01-0718hyp
- Plat J., Nichols JA, Mensink RP Esteroles y estanoles vegetales: efectos sobre la composición micelar mixta y la activación de LXR (gen diana). *J. Lipid Res.* 2005; 46 : 2468–2476. doi: 10.1194 / jlr.M500272-JLR200
- Prada, Sergio I, Yuri Takeuchi, and Yoseth Ariza. 2014. Costo Monetario Del Tratamiento de La Enfermedad de Alzheimer En Colombia Monetary Cost of Treatment for Alzheimer ' s Disease in Colombia. 30 (1): 247–55.
- Quintanilla R.A., Orellana D.I., González-Billault C., Maccioni R.B. Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway. *Exp Cell Res.* 2004;295:245–257.
- Qin, X., Wang, Y., & Paudel, H. K. (2016). Early Growth Response 1 (Egr-1) Is a Transcriptional Activator of  $\beta$ -Secretase 1 (BACE-1) in the Brain. *Journal of Biological Chemistry*, 291(42), 22276–22287. doi:10.1074/jbc.m116.738849
- Rastinejad, F., Huang, P., Chandra, V., & Khorasanizadeh, S. (2013). Understanding nuclear receptor form and function using structural biology. *Journal of molecular endocrinology*, 51(3), T1–T21. <https://doi.org/10.1530/JME-13-0173>
- Raulin, Ana-caroline, Lucas Kraft, Youssra K Al-hilaly, Feng Xue, John E Mcgeehan, John R Atack, and Louise Serpell. 2019. The Molecular Basis for Apolipoprotein E4 as the Major Risk Factor for Late-Onset Alzheimer's Disease“PT SC.” *Journal of Molecular Biology.* <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.019>.
- Regland, B., & McCaddon, A. (2019). Alzheimer's Amyloidopathy: An Alternative Aspect. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 68(2), 483–488. <https://doi.org/10.3233/JAD-181007>
- Rivero-Segura, NA, Coronado-Mares, MI, Rincón-Heredia, R., Pérez-Torres, I., Montiel, T., Pavón, N., Cabrera-Reyes, EA, Massieu, L. y Cerbón, M. (2019). La prolactina previene la disfunción mitocondrial inducida por la excitotoxicidad del glutamato en las neuronas del hipocampo. *Neurosci. Letón.* 701: 58–64.
- Rong, S., Cortés, V. A., Rashid, S., Anderson, N. N., McDonald, J. G., Liang, G., Moon, Y. A., Hammer, R. E., & Horton, J. D. (2017). Expression of SREBP-1c Requires SREBP-2-mediated

Generation of a Sterol Ligand for LXR in Livers of Mice. *eLife*, 6, e25015. <https://doi.org/10.7554/eLife.25015>

Rujeedawa, T., Carrillo Félez, E., Clare, I., Fortea, J., Strydom, A., Rebillat, A. S., Coppus, A., Levin, J., & Zaman, S. H. (2021). The Clinical and Neuropathological Features of Sporadic (Late-Onset) and Genetic Forms of Alzheimer's Disease. *Journal of clinical medicine*, 10(19), 4582. <https://doi.org/10.3390/jcm10194582>

Salmon DP, Thomas RG, Pay MM, Booth A, Hofstetter CR, Thal LJ, Koltzman R. Alzheimer's disease can be accurately diagnosed in very mildly impaired individuals. *Neurology*. 2002; 59:1022–1028

Samuels B. A., Y.P. Hsueh, T. Shu, H. Liang, H.C. Tseng, C.J. Hong, S.C. Su, J. Volker, R.L. Neve, D.T. Yue, L.H. Tsai. Cdk5 promotes synaptogenesis by regulating the subcellular distribution of the MAGUK family member CASK. *Neuron*, 56. 2007; pp. 823- 837

Sánchez, Carolina Ruiz De, Daniel Nariño, Joe Fernando, and Muñoz Cerón. 2010. "De Alzheimer Revisión" 26 (3)

Sandoval-Hernandez AG, Buitrago L, Moreno H, Cardona-Gomez GP, Arboleda G. Role of Liver X Receptor in AD Pathophysiology. *PLoS One*. 2015; 10(12):e0145467. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145467> PMID: 26720273

Santa-Maria, I., Varghese, M., Ksiezak-Reding, H., Dzhun, A., Wang, J., & Pasinetti, G. M. Paired helical filaments from Alzheimer disease brain induce intracellular accumulation of Tau protein in aggresomes. *The Journal of biological chemistry*. 2012; 287(24), 20522–20533. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.323279>

Santos-Gil, D. F., Arboleda, G., & Sandoval-Hernández, A. G. (2021). Retinoid X receptor activation promotes re-myelination in a very old triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience letters*, 750, 135764. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135764>

Santos, C. Y., Snyder, P. J., Wu, W. C., Zhang, M., Echeverria, A., & Alber, J. . Pathophysiologic relationship between Alzheimer's disease, cerebrovascular disease, and cardiovascular risk: A review and synthesis. *Alzheimer's & dementia (Amsterdam, Netherlands)*. 2017; 7, 69–87. <https://doi.org/10.1016/j.dadm.2017.01.005>

Sharma K. (2019). Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review). *Molecular medicine reports*, 20(2), 1479–1487. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10374>

Sever, R., & Glass, C. K. (2013). Signaling by nuclear receptors. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(3), a016709. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016709>

Shal, B., Ding, W., Ali, H., Kim, Y. S., & Khan, S. (2018). Anti-neuroinflammatory Potential of Natural Products in Attenuation of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Pharmacology*, 9. doi:10.3389/fphar.2018.0054

Shen, L., & Jia, J. (2016). An Overview of Genome-Wide Association Studies in Alzheimer's Disease. *Neuroscience bulletin*, 32(2), 183–190. <https://doi.org/10.1007/s12264-016-0011-3>

Šimić, G., Babić Leko, M., Wray, S., Harrington, C., Delalle, I., Jovanov-Milošević, N., Bažadona, D., Buée, L., de Silva, R., Di Giovanni, G., Wischik, C., & Hof, P. R. Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies. *Biomolecules*. 2016; 6(1), 6. <https://doi.org/10.3390/biom6010006>

- Simons, A., Ruppert, T., Schmidt, C., Schlicksupp, A., Pipkorn, R., Reed, J., Masters, C. L., White, A. R., Cappai, R., Beyreuther, K., Bayer, T. A., & Multhaup, G. (2002). Evidence for a copper-binding superfamily of the amyloid precursor protein. *Biochemistry*, 41(30), 9310–9320.
- Stachel, S. J., Zerbini, C., Rudd, M. T., Cosden, M., Suon, S., Nanda, K. K., ... Renger, J. (2016). Identification and in Vivo Evaluation of Liver X Receptor  $\beta$ -Selective Agonists for the Potential Treatment of Alzheimer's Disease. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(7), 3489–3498. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b001
- Stover Snitow, M. E., Bhansali, R. S., & Klein, P. S. (2021). Lithium and Therapeutic Targeting of GSK-3. *Cells*, 10(2), 255. <https://doi.org/10.3390/cells10020255>
- Stover, K. R., Campbell, M. A., Van Winnen, C. M., & Brown, R. E. (2015). Early detection of cognitive deficits in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research*, 289, 29–38. doi:10.1016/j.bbr.2015.04.012
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. Apolipoprotein-E – High-avidity binding to B-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993; 90:9649–9653.
- Su, Y. et al. Lithium, a common drug for bipolar disorder treatment, regulates amyloid-beta precursor protein processing. *Biochemistry*, 2004; 43, 6899–6908
- Susalka, S. J., Nikulina, K., Salata, M. W., Vaughan, P. S., King, S. M., Vaughan, K. T., & Pfister, K. K. (2002). The roadblock light chain binds a novel region of the cytoplasmic Dynein intermediate chain. *The Journal of biological chemistry*, 277(36), 32939–32946. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205510200>
- Terry, A. V., Jr, & Buccafusco, J. J. (2003). The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 306(3), 821–827.
- Thordardottir, S., Kinhlut Ståhlbom, A., Almkvist, O. et al. The effects of different familial Alzheimer's disease mutations on APP processing in vivo. *Alz Res Therapy* 9,9 (2017). <https://doi.org/10.1186/s13195-017-0234-1>
- Tiraboschi, P., Hansen, L. A., Masliah, E., Alford, M., Thal, L. J., & Corey-Bloom, J. (2004). Impact of APOE genotype on neuropathologic and neurochemical markers of Alzheimer disease. *Neurology*, 62(11), 1977–1983. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000128091.92139.0f>
- Toro-Fernández LF, Zuluaga-Monares JC, Saldarriaga-Cartagena AM, Cardona-Gómez GP y Posada-Duque R (2021) Orientación CDK5 en astrocitos promueve Homeostasis del calcio debajo Condiciones excitotóxicas. *Parte delantera. Celda. Neurosci.* 15: 643717. doi: 10.3389 / fncel.2021.64371
- Ulrich RG. The toxicogenomics of nuclear receptor agonists. *Curr Opin Chem Biol.* 2003;7(4):505-510. doi:10.1016/s1367-5931(03)00080-2
- Van Cauwenberghe, C., Van Broeckhoven, C. & Sleegers, K. The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives. *Genet Med.* 2016; 18, 421–430. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.117>
- van der Kant, R., Goldstein, L., & Ossenkuppele, R. (2020). Amyloid- $\beta$ -independent regulators of tau pathology in Alzheimer disease. *Nature reviews. Neuroscience*, 21(1), 21–35. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0240-3>
- Vanmierlo, T., Rutten, K., Dederen, J., Bloks, V. W., van Vark-van der Zee, L. C., Kuipers, F., Kiliaan, A., Blokland, A., Sijbrands, E. J., Steinbusch, H., Prickaerts, J., Lütjohann, D., & Mulder, M.

- (2011). Liver X receptor activation restores memory in aged AD mice without reducing amyloid. *Neurobiology of aging*, 32(7), 1262–1272. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.07.005>
- Vogel, J.W., Iturria-Medina, Y., Strandberg, O.T. et al. Spread of pathological tau proteins through communicating neurons in human Alzheimer's disease. *Nat Commun* 11, 2612 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15701-2>
- von Bergen M, Barghorn S, Li L, Marx A, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E . Las mutaciones de la proteína tau en la demencia frontotemporal promueven la agregación de filamentos helicoidales emparejados al mejorar la estructura beta local . *J Biol Chem* . 21 de diciembre de 2001; 276 (51): 48165-74
- Ward, Y., Spinelli, B., Quon, M. J., Chen, H., Ikeda, S. R., & Kelly, K. (2004). Phosphorylation of critical serine residues in Gem separates cytoskeletal reorganization from down-regulation of calcium channel activity. *Molecular and cellular biology*, 24(2), 651–661. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.2.651-661.2004>
- Walcher, D. (2006). LXR Activation Reduces Proinflammatory Cytokine Expression in Human CD4-Positive Lymphocytes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(5), 1022–1028. doi:10.1161/01.atv.0000210278.67076.8f
- Weggen, S. and Beher, D. Molecular consequences of amyloid precursor protein and presenilin mutations causing autosomal dominant Alzheimer's disease. *Alzheimer Research and Therapy*. 2012; 4 (2), 9. <https://doi.org/10.1186/alzrt107>
- Wightman, D. P., Jansen, I. E., Savage, J. E., Shadrin, A. A., Bahrami, S., Holland, D., ... Drange, O. K. (2021). A genome-wide association study with 1,126,563 individuals identifies new risk loci for Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 53(9), 1276–1282. doi:10.1038/s41588-021-00921-z
- Wischik C.M., Harrington C.R., Storey J.M.D. Tau-aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease. *Biochem. Pharmacol.* 2014 ;88:529–539. doi:10.1016/j.bcp.2013.12.008
- Wójcicka, G., Jamroz-Wiśniewska, A., Horoszewicz, K., & Bętkowski, J. (2007). Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. *Postepy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)*, 61, 736–759.
- Wyss-Coray T., Yan F., Lin A.H.-T., Lambris J.D., Alexander J.J., Quigg R.J. Prominent neurodegeneration and increased plaque formation in complement-inhibited Alzheimer's mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:10837–10842.
- Xia, Q., Yang, X., Shi, J., Liu, Z., Peng, Y., Wang, W., ... Gao, X. (2021). The Protective A673T Mutation of Amyloid Precursor Protein (APP) in Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, 58(8), 4038–4050. doi:10.1007/s12035-021-02385-y
- Xu, C., Liu, G., Ji, H., Chen, W., Dai, D., Chen, Z., Zhou, D., Xu, L., Hu, H., Cui, W., Chang, L., Zha, Q., Li, L., Duan, S., & Wang, Q. (2018). Elevated methylation of OPRM1 and OPRL1 genes in Alzheimer's disease. *Molecular medicine reports*, 18(5), 4297–4302. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9424>
- Yamazaki, Y., Zhao, N., Caulfield, T. R., Liu, C. C., & Bu, G. (2019). Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. *Nature reviews. Neurology*, 15(9), 501–518. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0228-7>
- Yin, F. T., Futagawa, T., Li, D., Ma, Y. X., Lu, M. H., Lu, L., Li, S., Chen, Y., Cao, Y. J., Yang, Z. Z., Oiso, S., Nishida, K., Kuchiiwa, S., Watanabe, K., Yamada, K., Takeda, Y., Xiao, Z. C., & Ma,

- Q. H. (2015). Caspr4 interaction with LNX2 modulates the proliferation and neuronal differentiation of mouse neural progenitor cells. *Stem cells and development*, 24(5), 640–652. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0261>
- Zelcer, N., Khanlou, N., Clare, R., Jiang, Q., Reed-Geaghan, E. G., Landreth, G. E., ... Tontonoz, P. (2007). Attenuation of neuroinflammation and Alzheimer's disease pathology by liver x receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(25), 10601–10606. doi:10.1073/pnas.0701096104
- Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain*. 2011;4:3. Published 2011 Jan 7. doi:10.1186/1756-6606-4-3
- Zhang, X., Heng, X., Li, T., Li, L., Yang, D., Zhang, X., Du, Y., Doody, R. S., & Le, W. (2011). Long-term treatment with lithium alleviates memory deficits and reduces amyloid- $\beta$  production in an aged Alzheimer's disease transgenic mouse model. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 24(4), 739–749. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-101875>
- Zheng H, Koo EH. Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Mol Neurodegener*. 2011 Apr 28;6(1):27. doi: 10.1186/1750-1326-6-27. PMID: 21527012; PMCID: PMC3098799.
- Zheng H, Koo EH. Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Mol Neurodegener*. 2011 Apr 28;6(1):27. doi: 10.1186/1750-1326-6-27. PMID: 21527012; PMCID: PMC3098799.
- Zhou, Z. D., Chan, C. H., Ma, Q. H., Xu, X. H., Xiao, Z. C., & Tan, E. K. (2011). The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis: Implications to pathogenesis and therapy of Alzheimer disease. *Cell adhesion & migration*, 5(4), 280–292. <https://doi.org/10.4161/cam.5.4.16986>

