



Universidad de la República

Facultad de Ciencias

Tesina para optar por el grado de Licenciado en  
Ciencias Biológicas

**DESARROLLO DE UN MODELO IN VITRO PARA  
EL ESTUDIO DEL PROCESO  
NEURODEGENERATIVO QUE OCURRE EN LA  
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

AUTOR: BACH. VICTORIA BOIX VIAZZI

TUTOR: DRA. FLORENCIA ARREDONDO UNANUA

Laboratorio de Neuroquímica, Instituto de Investigaciones  
Biológicas Clemente Estable (IIBCE)

Área I+D Biomédica, Centro Uruguayo de Imagenología  
Molecular (CUDIM)

Montevideo, Uruguay

Diciembre 2019

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer:

A la Dra. Florencia Arredondo por acompañarme como tutora, fue realmente un privilegio poder trabajar y aprender con ella. Agradezco la confianza mutua que nos permitió concluir con éxito este trabajo, obteniendo resultados muy interesantes que seguramente servirán de insumo para nuevas investigaciones.

Al Dr. Pablo Díaz-Amarrilla, sin él este trabajo no podría haberse llevado a cabo.

Al Dr. Federico Dajas-Bailador, quien nos enseñó la metodología utilizada en este trabajo y siempre estuvo disponible para evacuar dudas.

A mis compañeros del Laboratorio de Neuroquímica del IIBCE y del Área I+D Biomédica del CUDIM por las oportunidades brindadas para crecer en lo profesional, participando tanto en proyectos de investigación como en actividades de docencia y divulgación científica.

A mis compañeros y profesores de Facultad de Ciencias, por la calidad tanto técnica como humana. Me siento orgullosa de formar parte de la UdelaR y en particular de esta hermosa Facultad.

Por último, pero no menos importante, a mi familia y amigos que me apoyaron y alentaron incondicionalmente durante este proceso.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. Resumen</b> .....	V
<b>2. Introducción</b> .....	6
2.1. Antecedentes generales .....	6
2.1.1. Contexto socioeconómico de la EA .....	6
2.1.2. Etiopatología de la EA .....	7
2.1.3. Clasificación de la EA .....	9
2.1.4. Tratamientos para la EA .....	10
2.1.5. Neuroinflamación en la EA .....	10
2.1.6. Rol del astrocito en la EA .....	11
2.1.7. Papel del axón en los procesos neurodegenerativos .....	12
2.1.8. Muerte neuronal en la EA .....	13
2.1.9. Dispositivos de microfluído para el estudio de procesos neurodegenerativos .....	15
2.2. Antecedentes particulares .....	16
<b>3. Hipótesis</b> .....	16
<b>4. Objetivos</b> .....	17
<b>5. Metodología</b> .....	17
5.1. Cultivo primario de neuronas cortico-hipocampales de ratón C57BL/6J (E15-18) en cámaras de microfluído .....	17
5.2. Tratamiento de los cultivos cortico-hipocampales en cámaras de microfluído con medios condicionados de astrocitos .....	19
5.3. Ensayo de Inmunocitoquímica .....	20
5.4. Caracterización y cuantificación de la preservación, degeneración y fragmentación axonal .....	20
5.5. Cuantificación de núcleos condensados .....	22
5.6. Análisis estadístico .....	23
<b>6. Resultados</b> .....	24
6.1. Tratamiento somato-dendrítico por 24 hrs con MCA 3xTg-AD en cultivos cortico/hipocampales de 7 DIV: .....	24
6.2. Tratamiento axonal por 24 hrs con MCA 3xTg-AD en cultivos cortico/hipocampales de 7 DIV: .....	26
6.3. Tratamiento somato-dendrítico por 24 hrs con MCA 3xTg-AD en cultivos cortico/hipocampales de 12 DIV: .....	28

6.4. Tratamiento axonal por 24 hrs con MCA 3xTg-AD en cultivos cortico/hipocampales de 12-13 DIV:.....	30
<b>7. Discusión .....</b>	<b>32</b>
<b>8. Principales conclusiones y perspectivas.....</b>	<b>35</b>
<b>9. Bibliografía.....</b>	<b>36</b>

## 1. Resumen

La degeneración axonal es un paso crítico dentro de los procesos patológicos que tienen lugar en las enfermedades neurodegenerativas. Actualmente se propone que en etapas tempranas del desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer (EA) se dan alteraciones a nivel del axón previo a evidenciarse la muerte neuronal. Por lo tanto, resulta de interés el estudio de los mecanismos celulares y moleculares subyacentes a la degeneración axonal. Así mismo, estrategias terapéuticas capaces de prevenir la disfunción axonal y la pérdida de la conectividad neuronal, podrían retrasar el proceso neurodegenerativo en la EA.

El objetivo de este trabajo es desarrollar un modelo *in vitro* en cámaras de microfluído que permita avanzar en el estudio de los mecanismos subyacentes a los procesos axo-degenerativos y de muerte neuronal que se dan en la EA.

Nuestro equipo de trabajo ha evidenciado que cultivos de astrocitos derivados de ratón 3xTg-AD (modelo experimental de EA) resultan tóxicos en co-cultivo con neuronas cortico-hipocampales de ratón C57BL/6J. Además, su medio condicionado resulta tóxico para los cultivos neuronales, sugiriendo que este fenotipo libera factores neurotóxicos. Por lo tanto, en este trabajo, se ha adaptado el modelo de neurodegeneración por exposición al medio condicionado de astrocitos (MCA) 3xTg-AD, al modelo de cultivo en cámaras de microfluído, para estudiar los efectos locales de neurodegeneración ejercidos por los factores que libera este fenotipo de astrocitos.

Nuestros datos indican que el MCA 3xTg-AD tiene un efecto diferencial sobre las neuronas, dependiendo de si la exposición ocurre en la región somato-dendrítica o en la región axonal. La exposición al MCA 3xTg-AD en la región somato-dendrítica de neuronas cortico-hipocampales de 12 DIV, induce tanto muerte neuronal en el compartimento somato-dendrítico como degeneración y fragmentación axonal en el compartimento axonal. Por el contrario, la exposición a este medio en la región axonal distal promueve la preservación de los axones

y no muestra efecto tóxico a nivel somato-dendrítico.

Profundizar en el estudio de las vías locales de señalización que se activan en los diferentes compartimentos subcelulares de las neuronas frente a la exposición al MCA 3xTg-AD podría dilucidar estrategias terapéuticas dirigidas que atenúen los aspectos neurotóxicos que favorecen la neurodegeneración en la EA.

**Palabras clave:** Enfermedad de Alzheimer; neurodegeneración; cámaras de microfluído.

## **2. Introducción**

### **2.1. Antecedentes generales**

#### **2.1.1. Contexto socioeconómico de la EA**

La prevalencia mundial de la demencia en 2018 fue de aproximadamente 50 millones de personas y para el 2050 se prevé que esta cifra alcance los 152 millones (Patterson, 2018).

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la responsable del 60-80% de los casos de demencia, afectando al 5-10% de la población mundial mayor de 65 años, con una prevalencia que se incrementa exponencialmente con la edad. En este sentido, el progresivo envejecimiento de la población mundial supone un mayor porcentaje de personas en edad de riesgo (Patterson, 2018).

Asimismo, la EA está entre las dolencias con mayores costos sociales y económicos a nivel mundial. El costo actual de la enfermedad es de aproximadamente un billón de dólares al año, y se prevé que se duplique para 2030. Esta cifra incluye un costo estimado para los "cuidadores informales", las personas que actúan como enfermeras de sus seres queridos las 24 horas del día. El número anual de cuidado informal se estima en alrededor de 82 mil millones de horas y el 71% de esas horas son proporcionadas por mujeres (Patterson, 2018).

A la fecha no existen terapias efectivas para la cura de esta enfermedad. Solo alrededor del 10% de la investigación mundial sobre la demencia se realiza en países de renta media y baja como los de nuestra región, a pesar de que es donde vive el 66% de la población mundial que padece esta enfermedad. Ese 66% se incrementará a 72% para 2050. De los países de América Latina, solo Chile, Costa Rica y Cuba cuentan con planes nacionales de demencia (Patterson, 2018).

Uruguay es el país con mayor proporción de población envejecida de América Latina. En 2016 la Asociación Uruguaya de Alzheimer y

Similares (AUDAS) lanzó una propuesta de políticas públicas para promover y garantizar los derechos humanos de las personas con demencia y sus familiares. Dicha propuesta plantea como uno de los pilares centrales a la investigación: “Tomando en cuenta la prioridad en salud que debería tener el tema de las demencias en la actualidad, sería beneficioso contar con convocatorias concursables periódicas u ocasionales para proyectos de investigación en organismos existentes como ANII, CSIC o el Espacio Interdisciplinario, así como impulsar a nivel político la asignación de fondos a programas vinculados con la temática en organismos internacionales.” (AUDAS, 2016).

### **2.1.2. Etiopatología de la EA**

En 1906 Alois Alzheimer reportó la primera descripción de la enfermedad de demencia que hoy lleva su nombre (Herrup, 2010). Los síntomas de esta enfermedad incluyen pérdida de memoria reciente, dificultades en la concentración, planificación, habla y escritura, confusión general sobre el tiempo y espacio, falta de juicio y cambios en el humor (Ballard *et al.*, 2011). La evaluación clínica minuciosa sigue siendo actualmente la única forma de diagnóstico de la EA, aunque la tomografía de emisión de positrones (PET), que permite, de forma no invasiva, la detección de proteínas características de esta enfermedad ayuda también en la clasificación de la EA (Kincaid *et al.*, 2016; Kreisl *et al.*, 2016; Ossenkoppele *et al.*, 2016).

Morfológicamente, en estudios histopatológicos post-mortem, la EA avanzada se manifiesta mediante una disminución significativa del volumen cerebral, especialmente en áreas de la corteza y el hipocampo, a causa de una muerte masiva de neuronas (Fricker *et al.*, 2018). La etiología de la muerte neuronal en esta enfermedad no es del todo clara, ya que la EA avanza a lo largo de muchos años, por lo que la cantidad de neuronas que mueren por día, por área cerebral, es muy baja como para poder investigar los mecanismos subyacentes que desencadenan dicho desenlace (Fricker *et al.*, 2018).

La EA se define principalmente por dos características

moleculares: la deposición de placas amiloides a nivel extracelular y la presencia de ovillos neurofibrilares intracelulares compuestos por la proteína tau hiperfosforilada (Fricker et al., 2018).

Las placas consisten en fragmentos peptídicos de la proteína precursora de amiloide (APP), que es una glicoproteína de membrana tipo I de gran tamaño que se encuentra asociada con diversos organelos celulares como, por ejemplo, vesículas que experimentan un rápido transporte axonal, lisosomas, mitocondrias, retículo endoplasmático y membrana plasmática (Kins *et al.*, 2006; Rajendran *et al.*, 2012). A través de la escisión secuencial por parte de las enzimas  $\beta$  y  $\gamma$  secretasa, la proteína APP se procesa para producir péptidos A $\beta$ 1–40/1–42. Estos péptidos primero forman estructuras oligoméricas y luego fibrillas que son las que por último van a dar lugar a las placas amiloides. La evidencia apunta a que los oligómeros del péptido A $\beta$ 1-42 son más propensos a la formación de fibrillas y por ende son las especies más tóxicas (Fricker *et al.*, 2018).

Actualmente se sugiere que la versión hiperfosforilada de tau es un mediador importante de la toxicidad amiloide (Li *et al.*, 2015; Zempel *et al.*, 2013). Mientras que los depósitos de amiloide extracelulares están compuestos de una estructura en hoja- $\beta$  e inducen efectos locales, los ovillos neurofibrilares aparecen a nivel intracelular y tienen efectos específicos en diferentes poblaciones neuronales (Fricker *et al.*, 2018). Los ovillos neurofibrilares se definen como filamentos insolubles helicoidales compuestos por la proteína tau hiperfosforilada. Tau es una fosfoproteína que se asocia a microtúbulos y, en el cerebro humano adulto, se puede encontrar bajo seis isoformas debido al empalme alternativo del gen *MAMT* que codifica a tau. Estas isoformas se distinguen por 0, 1 y 2 insertos NH2-terminal y/o 3 o 4 repetidos del dominio de unión a microtúbulos (Spillantini y Goedert, 2013). Tau estabiliza los microtúbulos, por lo tanto, la hiperfosforilación de tau, que disminuye el grado de asociación a los microtúbulos, provoca la desestabilización de los mismos y genera un impacto negativo en el transporte axonal (Fricker *et al.*, 2018). Estudios histopatológicos han

sugerido que la EA comienza primero con la formación anormal de ovillos neurofibrilares en el locus coeruleus, luego progresa hacia las cortezas transentorhinal y entorhinal, y por último al hipocampo y el resto de la neocorteza (Braak y Del Tredici, 2015). En este escenario, las placas A $\beta$ , en comparación con la proteína tau hiperfosforilada y los ovillos neurofibrilares, aparecen en individuos de edad más avanzada (Fricker *et al.*, 2018).

### **2.1.3. Clasificación de la EA**

La EA de aparición temprana (antes de los 65 años) representa hasta el 5% de todos los casos de EA y la mayoría de estos casos son de tipo familiar (Winblad *et al.*, 2016). En la EA de tipo familiar, mutaciones en los genes que codifican para la proteína APP (*APP*) o para la presenilina (*PSEN 1* y *PSEN 2*), derivan en la acumulación de la forma de 42 aminoácidos del péptido amiloide que tiene una alta tendencia a formar las estructuras plegadas en hoja-beta (Winblad *et al.*, 2016). La presenilina es una subunidad catalítica de la  $\gamma$ -secretasa, la enzima encargada de liberar el péptido A $\beta$ 1-42 del extremo C-terminal de la proteína APP (Herrup, 2010).

Los pacientes de tipo no familiar, con EA de aparición esporádica, por lo general son de edad más avanzada (a partir de los 65 años) y es la forma más común de EA, representando aproximadamente el 95% de todos los casos (Winblad *et al.*, 2016). La etiología precisa de la EA esporádica no se conoce en detalle, sin embargo se sabe que el mayor factor de riesgo es la edad (Herrup, 2010). En todas las especies, la edad trae un progresivo enlentecimiento del funcionamiento del cerebro en todos los dominios. Nuestra cognición se enlentece; nuestra habilidad para formar nuevas memorias se reduce; nuestras funciones motoras se deterioran; incluso las funciones homeostáticas de nuestro cerebro se vuelven cada vez menos robustas (Herrup, 2010). Este declive funcional está correlacionado con la pérdida de la complejidad estructural de las células cerebrales. Las dendritas neuronales se vuelven menos complejas, las espinas dendríticas y la densidad sináptica decrece, en el

soma de las neuronas se acumula lipofuscina, la función astrocitaria declina (por ejemplo, en la recaptura y reciclado del glutamato), nuestro sistema inmune se vuelve menos sensible, etc. Y mientras esta lista de insuficiencias crece, las defensas del cerebro contra muchas enfermedades, incluyendo la EA, se ven debilitadas (Herrup, 2010). Aunque el envejecimiento gradualmente afecta nuestro cerebro, la hipótesis actual para la EA esporádica estipula que algún evento: un traumatismo de cráneo, una enfermedad o infección grave, un evento vascular (posiblemente tan pequeño como para ser clínicamente indetectable), el estrés metabólico asociado con el inicio de la diabetes vinculada con la vejez o incluso el estrés asociado con un evento importante de la vida, como la muerte de un familiar, se requiere para iniciar el proceso de la enfermedad. El daño desencadena una respuesta protectora entre las células del cerebro, pero el fallo de los mecanismos homeostáticos relacionados con la edad hace que la respuesta continúe, incluso cuando la lesión desaparece. El concepto clave es que es la naturaleza de la respuesta, no la naturaleza de la lesión, lo que determina la aparición de la EA (Herrup, 2010).

#### **2.1.4. Tratamientos para la EA**

Desde 1998, 100 medicamentos han sido estudiados a nivel clínico y solo cuatro finalmente autorizados para su administración en pacientes. A su vez, de estos cuatro, ninguno logra realmente curar la enfermedad, sino que se administran como medidas paliativas. Esta elevada tasa de fracaso posiblemente se deba a que la gran mayoría de los enfoques terapéuticos se han centrado en el péptido A $\beta$  y no se ha logrado atacar otro tipo de componentes de la enfermedad como por ejemplo la neuroinflamación, la respuesta glial, la degeneración axonal y la muerte de neuronas (Patterson, 2018).

#### **2.1.5. Neuroinflamación en la EA**

La inflamación es una respuesta inmunológica protectora fundamental por la cual las células del sistema inmune reaccionan de

manera equilibrada en presencia de células o residuos inesperados, por ejemplo, frente a microorganismos patógenos (Karin y Clevers, 2016). Los cambios metabólicos observados en las células a lo largo del envejecimiento (daño en el ADN, pérdida de proteostasis, señales de estrés, desequilibrio redox) afectan la respuesta inmune contra estos patógenos y además pueden convertirse en un factor importante en la patogénesis de muchas enfermedades humanas crónicas, incluida la EA (Ayyaz y Jaspe, 2013).

Recientemente la participación de la neuroinflamación en la EA ha sido objeto de investigación, en parte debido a sus implicaciones clínicas. Se ha demostrado que, en respuesta a la A $\beta$  fibrilar, las células gliales producen y liberan una serie de moléculas proinflamatorias que pueden atenuar la fagocitosis microglial, lo que favorece la acumulación de placas amiloides en el cerebro (Medeiros y LaFerla, 2013).

#### **2.1.6. Rol del astrocito en la EA**

Actualmente existe un creciente interés por el papel que cumplen los diferentes tipos celulares en los procesos neurodegenerativos, pasando por abordajes multicelulares que incluyen tanto a las neuronas como a las células gliales (Patterson, 2018). Tal es el caso de los astrocitos, células gliales complejas y altamente diferenciadas, que cubren de manera contigua todo el sistema nervioso central (SNC) y realizan numerosas contribuciones esenciales para su correcto funcionamiento.

Entre las funciones que cumplen se incluye la regulación del flujo sanguíneo y provisión de metabolitos energéticos a las neuronas, la participación en la función sináptica y la plasticidad, y el mantenimiento del equilibrio extracelular de iones, balance de líquidos y neurotransmisores (Barres, 2008). Además, los astrocitos responden a todas las formas de daño que afectan al SNC (infecciones, traumatismos, isquemia y enfermedades neurodegenerativas), mediante un proceso comúnmente denominado astrogliosis reactiva (Maragakis y Rothstein, 2006).

La astrogliosis reactiva es un proceso finamente graduado y continuo de cambios progresivos en la morfología y expresión génica. Estos cambios están sutilmente regulados por una compleja señalización inter e intracelular (Sofroniew, 2009). En algunos casos, mecanismos específicos de señalización tienen el potencial de inducir efectos diferentes en los astrocitos reactivos y en ocasiones opuestos, por ejemplo, al estimular la producción de moléculas que podrían ser tanto pro como antiinflamatorias, o que podrían aumentar o reducir el estrés oxidativo. Estos efectos aparentemente paradójicos no necesitan ser vistos como contradictorios, sino que los astrocitos reactivos pueden ejercer diferentes efectos en respuesta a diferentes tipos de daño o durante diferentes fases de la respuesta a medida que la misma progresa en el tiempo (Sofroniew, 2009).

En la EA, los astrocitos reactivos tienden a localizarse alrededor de las placas amiloides fibrilares y de las neuronas en proceso degenerativo. Esto sugiere que el depósito de A $\beta$  es un potente desencadenante de la activación astrocitaria que conduce a la patología neuronal (Medeiros y LaFerla, 2013). En estudios in vivo e in vitro, el tratamiento con A $\beta$ 1-42 induce un fenotipo reactivo de astrocitos caracterizado por el aumento de la producción de factores de crecimiento y mediadores inflamatorios como, por ejemplo, el factor de crecimiento nervioso (NGF), interleucina (IL) -1 $\beta$ , IL-6, factor de necrosis tumoral-  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) y óxido nítrico (NO), que pueden afectar críticamente la función neuronal y la supervivencia (Carrero *et al.*, 2012; Sáez *et al.*, 2006).

Una mayor comprensión de dicho potencial de señalización combinatoria podría facilitar estrategias terapéuticas dirigidas que preserven los beneficios y atenúen los aspectos potencialmente perjudiciales de la astrogliosis reactiva (Sofroniew, 2009).

### **2.1.7. Papel del axón en los procesos neurodegenerativos**

La estructura polarizada de la neurona implica una segregación espacial entre la región somato-dendrítica y el axón y es esencial para el

mantenimiento de las redes neuronales en el cerebro. La correcta funcionalidad del axón es altamente dependiente del transporte axonal que por un lado abastece a los axones de proteínas, lípidos y energía, y por el otro, remueve proteínas mal plegadas para evitar la formación de agregados tóxicos. Se ha propuesto que alteraciones en el transporte axonal llevan a la acumulación de moléculas-cargo a nivel del axón y que el mal funcionamiento de las herramientas celulares para la remoción de proteínas (proteosoma, autofagia) contribuye a la degeneración axonal y neuronal en las enfermedades neurodegenerativas como la EA (Morfini, *et al.*, 2009).

En la EA, las alteraciones a nivel del axón no serían eventos “todo o nada” sino que ocurrirían en regiones localizadas del axón, en etapas tempranas del desarrollo de la enfermedad. Una vez alcanzado cierto umbral de acumulación de daños comenzaría a manifestarse la disfunción y degeneración axonal. En este paso, la falta de señalización trófica, junto a procesos de disfunción mitocondrial y estrés oxidativo, desregulación de Ca<sup>2+</sup> y fallo de mecanismos proteosomales o autofágicos desencadenarían una neurodegeneración generalizada (Brady y Morfin, 2010). Por lo tanto, estrategias terapéuticas que apunten a prevenir la disfunción axonal y la pérdida de la conectividad neuronal podrían retrasar el proceso degenerativo que ocurre en la EA.

### **2.1.8. Muerte neuronal en la EA**

La muerte de neuronas ocurre en gran medida durante el desarrollo del SN y es esencial para la formación adecuada del circuito neuronal (Fricker *et al.*, 2018). Por otro lado, la muerte neuronal juega un papel especialmente importante en las enfermedades neurodegenerativas, debido a la capacidad limitada que tienen las neuronas durante la adultez de proliferar o ser remplazadas (Fricker *et al.*, 2018). Antes se pensaba que había simplemente dos o tres programas de muerte celular, sin embargo, hoy en día se sabe que existen por lo menos una docena de vías por las cuales las neuronas mueren y que células no-neuronales también contribuyen en este proceso (Fricker *et al.*, 2018).

Tres conceptos importantes han emergido de la reciente literatura sobre la muerte neuronal: 1) hay muchos mecanismos por los cuales una neurona puede morir, 2) existe una participación cruzada, y hasta a veces ambigua, entre varios mecanismos de muerte celular y 3) la muerte neuronal no es un evento celular autónomo, sino que frecuentemente se desencadena por interacciones con otras células neuronales o gliales del entorno celular (Fricker *et al.*, 2018).

En 1972, Kerr, Wyllie, y Currie distinguieron dos tipos de muerte celular (apoptosis y necrosis) basados en la morfología celular de muestras patológicas humanas. Identificaron a las células apoptóticas por su condensación nuclear y citoplasmática, por procesos de fragmentación y por su eliminación a través del proceso de fagocitosis. Por otro lado, identificaron a las células necróticas como “hinchadas” con organelos “hinchados”, que subsecuentemente estallan para liberar sus contenidos al espacio extracelular, lo que desencadenaba una respuesta inflamatoria (Kerr, Wyllie y Curie, 1972). Así, en el cerebro, la necrosis puede representar un "doble golpe" de pérdida neuronal irreversible acoplada a la iniciación o al incremento de la neuroinflamación potencialmente dañina (Fricker *et al.*, 2018). Actualmente, el significado del término necrosis se ha convertido en sinónimo de ruptura de la membrana plasmática, y se ha hecho evidente que hay muchos mecanismos diferentes que pueden llevar a este fin. Las diversas formas de necrosis conocidas hasta el momento incluyen: necroptosis, parthanatos, ferroptosis, piroptosis, autólisis y transición de la permeabilidad mitocondrial (mPT) (Fricker *et al.*, 2018).

Notablemente, la formación del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (mPTP) se ha relacionado fuertemente con la degeneración axonal (Barrientos *et al.*, 2011; Villegas *et al.*, 2014), desencadenando el aumento de las especies reactivas del oxígeno (ROS) en el axón y la liberación de calcio intra-axonal (Calixto *et al.*, 2012; Villegas *et al.*, 2014). También este proceso se ha vinculado con la patogénesis de la EA (Du *et al.*, 2008) y ha sido sugerido como un potencial blanco terapéutico para esta enfermedad (Salvadores, 2017).

### **2.1.9. Dispositivos de microfluído para el estudio de procesos neurodegenerativos**

Durante mucho tiempo, la investigación sobre la biología axonal en el sistema nervioso central (SNC) se ha visto obstaculizada por la falta de un método *in vitro* apropiado para estudiar los axones independientemente de los somas neuronales. Actualmente, muchos estudios utilizan sistemas de microfluído fabricados con polidimetilsiloxano (PDMS) que permiten el control químico, espacial y temporal necesario para estudiar los diferentes dominios y procesos subcelulares (Millet y Gillette, 2012). Entre las utilidades de estos dispositivos se destaca su uso para inmunoensayos en miniatura, la separación de proteínas y ADN, la clasificación y manipulación de células, y como biorreactores a microescala. También se puede utilizar para aislar y direccionar el crecimiento de axones del SNC, proveyendo un sistema altamente adaptable para modelar muchos aspectos de la neurodegeneración y lesión en el SNC, y para testear compuestos de interés con potencial regenerativo. Se ha investigado también a los dispositivos de microfluído como un modelo *in vitro* de daño axonal, demostrando la habilidad para lesionar selectivamente los axones y analizar bioquímicamente el soma y su expresión génica inmediata (Taylor *et al.*, 2005).

En el caso particular de la EA, existen trabajos previos que emplean estos dispositivos tanto para estudiar la propagación de la enfermedad (Wang *et al.*, 2017), como para profundizar en los procesos neurodegenerativos frente a distintos estímulos tóxicos asociados a procesos patológicos que ocurren en la EA, tales como el glutamato o A $\beta$  (Hosie *et al.*, 2012; Deleglise *et al.*, 2014).

Hosie y colaboradores, estudiaron el efecto axo-degenerativo del glutamato sobre cultivos primarios de neuronas corticales de ratón en dispositivos de microfluído. Los resultados indicaron que el tratamiento con glutamato en el compartimento somato-dendrítico desencadena un

proceso degenerativo tanto en los axones distales como en la región somato-dendrítica. Por otro lado, el tratamiento con glutamato en el compartimento axonal desencadena una menor degeneración axonal y no produce cambios a nivel del compartimento somato-dendrítico (Hosie *et al.*, 2012).

Por su lado, Deleglise y colaboradores también realizaron este experimento, pero aplicando péptido A $\beta$  localmente a los diferentes compartimentos celulares. Estos investigadores observaron que la aplicación de A $\beta$  en el compartimento somato-dendrítico desencadena un proceso de degeneración por “dying back”, donde las anomalías en la función sináptica y la integridad axonal preceden a la muerte del soma neuronal (Deleglise *et al.*, 2014). Por otro lado, el tratamiento con A $\beta$  en el compartimento axonal no indujo degeneración axonal ni muerte somática (Deleglise *et al.*, 2014).

## **2.2. Antecedentes particulares**

A partir del 2016, en el marco de una colaboración IIBCE-CUDIM, nuestro equipo de trabajo se ha enfocado en la caracterización de un fenotipo de astrocitos cortico/hipocampales derivados de ratones 3xTg-AD (modelo experimental de Alzheimer) en estadio sintomático. Este fenotipo de astrocitos resulta ser tóxico en co-cultivo con neuronas cortico/hipocampales derivadas de ratones C57BL/6J (E15-18). Además, su medio condicionado también resulta tóxico en cultivos de neuronas corticales/hipocampales a diferentes estadios *in vitro* (7-15), sugiriendo que este fenotipo libera factores neurotóxicos.

## **3. Hipótesis**

A partir de los antecedentes generales y particulares anteriormente mencionados, en este trabajo se plantearon las siguientes hipótesis:

- 1- El medio condicionado de astrocitos (MCA) 3xTg-AD induce un efecto neurotóxico diferencial, con mayor toxicidad cuando se aplica en el compartimento somato-dendrítico que en el compartimento axonal

2- El efecto neurotóxico del medio 3xTg-AD se evidencia más allá de la edad *in vitro* a la que los cultivos neuronales sean tratados.

#### **4. Objetivos**

Este trabajo propone desarrollar un modelo *in vitro* en cámaras de microfluído que permita avanzar en el estudio de los mecanismos subyacentes a los procesos axo-degenerativos y de muerte neuronal que se dan en la EA.

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Desarrollar un modelo *in vitro* de cultivo primario de neuronas cortico-hipocampales en cámaras de microfluído.
2. Adaptar el modelo de neurodegeneración por exposición al MCA 3xTg-AD a las cámaras de microfluído.
3. Analizar el grado de neurodegeneración, en los diferentes compartimentos de las cámaras de microfluído, luego de la exposición al MCA 3xTg-AD.

#### **5. Metodología**

##### 5.1. Cultivo primario de neuronas cortico-hipocampales de ratón C57BL/6J (E15-18) en cámaras de microfluído

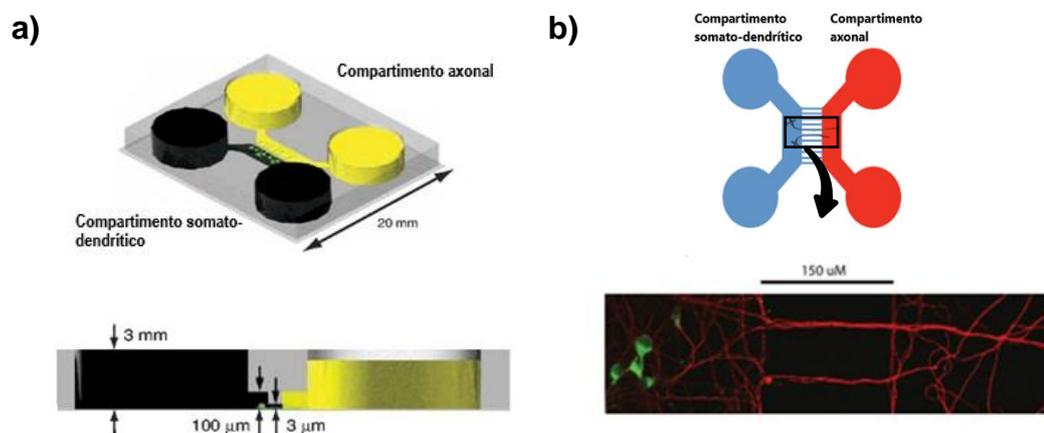
La cría, reproducción y mantenimiento de los animales se llevó a cabo por personal especializado en las instalaciones del Bioterio del Área Biomédica de I+D del CUDIM. La eutanasia de los animales fue llevada a cabo por la Dra. Florencia Arredondo según los protocolos avalados por los diferentes comités de ética del IIBCE y del CUDIM.

Entre los días 15 y 18 de gestación, se realizó la eutanasia de las hembras de la cepa C57BL/6J, para la obtención de sus fetos. A partir de los mismos, se disecó la corteza e hipocampo para realizar los cultivos celulares primarios, mediante un protocolo adaptado a partir de la metodología descrita por Smith y colaboradores (Smith *et al.*, 2005).

Se sembraron los neuroblastos obtenidos sobre cámaras de

microfluído de Xona Microfluidics™, montadas en placas de plástico de 35mm, previamente tratadas con sustrato de adhesión de poli-L-ornitina (0,05mg/ml). Los cultivos se mantuvieron en medio Neurobasal suplementado con 2% B27, 0.5 mM Glutamax, y antibióticos, a 5% CO2 y 37°C, hasta el momento de los ensayos. Se realizaron cambios parciales de medio cada 2-3 días in vitro (DIV).

Las cámaras de microfluído son dispositivos de polidimetilsiloxano (PDMS) especialmente diseñados para realizar cultivos en dos compartimentos. Estos compartimentos están conectados a través de microcanales paralelos que permiten únicamente el pasaje de axones en crecimiento. A su vez, se pueden aislar los compartimentos entre sí mediante una diferencia de volumen que genera resistencia de flujo. De esta manera, estos dispositivos permiten estudiar los diferentes dominios subcelulares, axones y somas-dendritas, por separado (Figura 1).



**Figura 1. Cámaras de microfluído** a) Representación esquemática del dispositivo de cámara de microfluído con los distintos compartimentos, somato-dendrítico y axonal. Se muestra, en esta representación, el compartimento somato-dendrítico con mayor volumen con respecto al compartimento axonal, lo que va a generar una resistencia de flujo que determina el aislamiento de fluidos entre ambos compartimentos. b) Imagen de microscopía confocal de fluorescencia donde se ven los somas en verde (otx-1 somático) y los axones en rojo (tubulina acetilada axonal) (Dajas-Bailador *et al.*, 2012). El esquema superior representa la localización de donde fue tomada la imagen. Se puede observar como las neuronas sembradas en el compartimento somato-dendrítico proyectan sus axones al compartimento axonal a través de microcanales de 150µm.

Según Taylor y colaboradores, después de 7 DIV, los axones se

extienden a través de los microcanales de 150  $\mu\text{m}$  hacia el compartimento axonal, mientras que las dendritas quedan retenidas en el compartimento somato-dendrítico (Taylor *et al.*, 2005). Este escenario se mantiene así hasta 14 DIV, momento en el cual se comienzan a detectar dendritas en el compartimento axonal. Para remediar esto, y poder aislar axones maduros de entre 10 y 14 DIV, Taylor y colaboradores aumentaron el ancho de los microcanales a 450  $\mu\text{m}$ . De esta manera, los distintos formatos de cámara, 150 y 450  $\mu\text{m}$ , permiten aislar axones en distinto estado de madurez.

## 5.2. Tratamiento de los cultivos cortico-hipocampales en cámaras de microfluído con medios condicionados de astrocitos

Una vez cultivadas las neuronas cortico-hipocampales en las cámaras de microfluído, se evaluó el efecto del medio condicionado neurotóxico de la línea astrocitaria derivada de ratones 3xTg-AD (cepa B6;129-Tg (APP<sup>Swe</sup>, tau<sup>P301L</sup>)1Lfa Psen1<sup>tm1Mpm/Mmjax</sup>), desarrollada y mantenida por el Dr. Pablo Díaz-Amarilla en las instalaciones del Área I+D Biomédica del CUDIM. El modelo murino triple transgénico 3xTg-AD es uno de los modelos transgénicos más completos para el estudio de la EA, que expresa las mutaciones humanas APP<sup>swe</sup> y tau<sup>P301L</sup> en un ratón Knock-in para PS1<sup>M146V</sup>. Estos transgenes se expresan bajo el control transcripcional de un cassette Thy 1.2 y desarrollan un fenotipo neuropatológico relacionado al envejecimiento que incluye tanto la formación de placa amiloide como de ovillos neurofibrilares. La relevancia de este modelo experimental es que la disfunción sináptica y la patología axonal preceden a la deposición de placas de amiloide y a la agregación de tau (Oddo *et al.*, 2003).

El medio condicionado 3xTg-AD se dispuso en los reservorios correspondientes al lado axonal o al lado somato-dendrítico por 24 hrs en distintos estadios del cultivo (7-8 DIV y 12-13 DIV). Para los tratamientos de 7-8 DIV se utilizaron cámaras de 150 $\mu\text{m}$  y para los tratamientos de 12-13 DIV cámaras de 450  $\mu\text{m}$ . Para asegurar el aislamiento de fluidos entre los distintos compartimentos se generó una diferencia de volumen de 50

$\mu$ L a favor del lado no tratado. Como tratamiento control se utilizó MCA derivados de ratones C57BL/6J (no Tg).

### 5.3. Ensayo de Inmunocitoquímica

Luego de 24 hrs de tratamiento, los cultivos se fijaron con PFA 4% durante 20-30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió a la permeabilización con PBS/Glicina 0,2% Tritón durante 30 minutos y al bloqueo con BSA 3% por 60 minutos. Se incubó durante toda la noche a 4°C con anticuerpo primario para marcar  $\beta$  tubulina III generado en ratón (T8578 SIGMA) y luego con anticuerpo secundario anti-ratón Alexa 488 generado en cabra (Thermo #A-A-11029) por 90 minutos. Por último, se utilizó Hoechst 33342 para identificar núcleos. Las imágenes se adquirieron en el microscopio confocal Zeiss 800 de la plataforma de microscopía confocal del IIBCE a una magnificación de 20X y se analizaron utilizando el software ImageJ del NIH.

### 5.4. Caracterización y cuantificación de la preservación, degeneración y fragmentación axonal

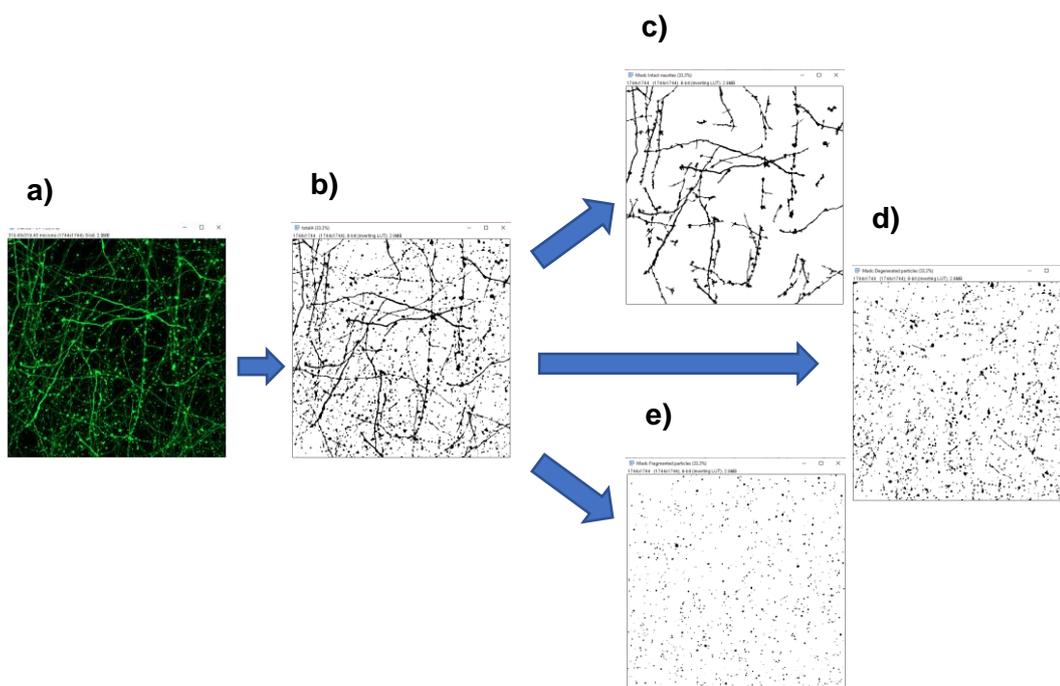
Los axones tienden a sufrir un patrón relativamente consistente de cambios físicos progresivos durante el proceso de degeneración. Primero, se vuelven distróficos a medida que se hinchan a lo largo de su longitud. A continuación, comienzan a segmentarse creando segmentos delgados y segmentos redondeados más grandes conocidos como esferoides. Los esferoides son características aparentes de los axones en proceso de degeneración. A medida que avanza la degeneración, los axones se fragmentan físicamente por medio de sus segmentos delgados, quedando únicamente los esferoides a la vista. Finalmente, los residuos del axón se degradan más allá de la detección (Raff *et al.*, 2002). Estos cambios morfológicos de los axones se pueden utilizar para estudiar el proceso y el alcance de la degeneración axonal tanto in vivo como in vitro (Kneynsberg *et al.*, 2016).

En este trabajo, para poder identificar y cuantificar el patrón de

degeneración axonal descrito anteriormente, se obtuvieron 4 imágenes en diferentes regiones a lo largo del compartimento axonal de cada cámara de microfluído en el microscopio Zeiss 800 a una magnificación de 20x y se procesaron dichas imágenes en el software ImageJ (Figura 2a).

El procesamiento y análisis de dichas imágenes se realizó mediante la adaptación de una macro, desarrollada por colaboradores del laboratorio del Dr. Federico Dajas-Bailador en la Universidad de Nottingham, que logra automatizar el procesamiento y análisis de cada imagen de forma sistemática. Dicha macro primero procesa la imagen mediante el uso del aumento de contraste y normalización, y luego aplica un filtro gaussiano que disminuye el ruido de fondo y maximiza la señal. Por último, los axones son identificados mediante el algoritmo de umbral Otsu (Figura 2b). El método de Otsu es el elegido por Kneynsberg y colaboradores, y se trata de un algoritmo que contrasta la intensidad del fondo de la imagen con respecto a la tinción positiva. Esto resulta en la identificación de un umbral que logra una mejor separación de cada pixel en una clase binaria (Kneynsberg *et al.*, 2016). Luego de obtener el umbral, la macro utiliza el analizador de partículas para cuantificar. Se automatizó esta herramienta para que calcule el área de las partículas y las logre separar en base al tamaño y circularidad de las mismas. En primera instancia, esta herramienta calcula el área que ocupan las partículas de tamaño mayor a 1001px y que tienen circularidad entre 0 y 1 (Figura 2c). El resultado se normaliza con respecto al área total que ocupan las partículas de la imagen y a esta relación se la denomina índice de preservación.

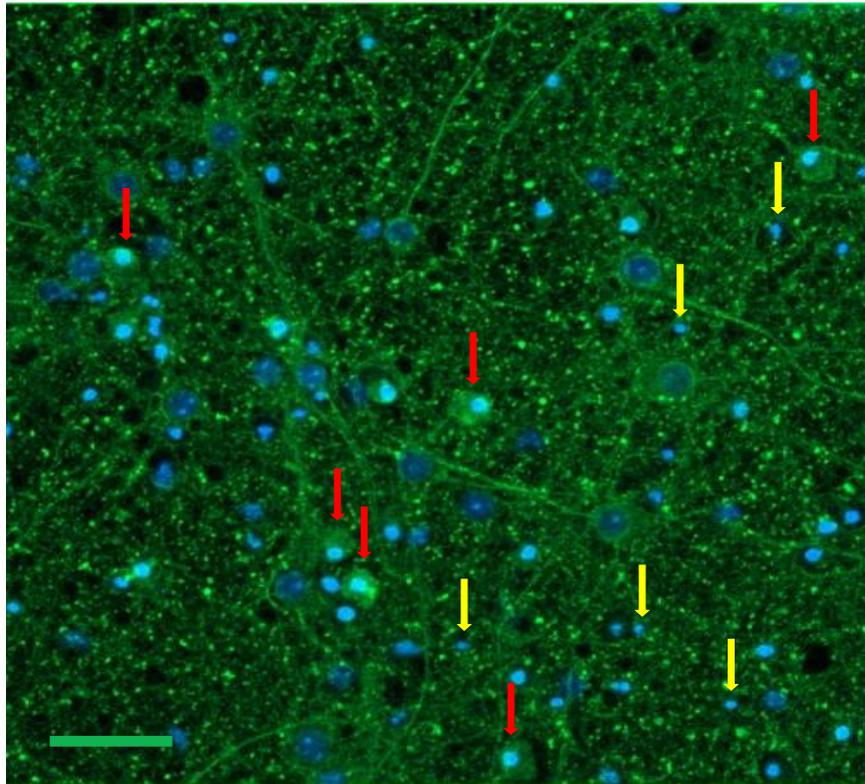
Este índice es un indicador de cantidad de axones intactos y se utiliza en este trabajo para comparar estadísticamente los diferentes tratamientos (no-Tg y 3xTg-AD). A continuación, se realizó el mismo procedimiento para medir el índice de degeneración (tamaño de partículas menor a 1000px y circularidad entre 0 y 1) (Figura 2d) y el índice de fragmentación (tamaño de partículas menor a 1000px y circularidad entre 0,9 y 1) (Figura 2e).



**Figura 2. Resumen del procesamiento de una imagen del compartimento axonal para cuantificar el índice de preservación, degeneración y fragmentación axonal. a)** Imagen del compartimento axonal adquirida en un microscopio Zeiss 800 a una magnificación de 20x pronta para ser procesada en el software ImageJ. **b)** Umbral de la imagen procesada en el software ImageJ. **c)** Máscara de axones intactos obtenida por el plugin analizador de partículas. **d)** Máscara de axones en proceso degenerativo obtenida por el plugin analizador de partículas del software ImageJ. **e)** Máscara de axones fragmentados obtenida por el plugin analizador de partículas del software ImageJ.

### 5.5. Cuantificación de núcleos condensados

Para cuantificar los núcleos condensados en los distintos tratamientos (no-Tg y 3xTgV) se obtuvieron 4 imágenes en regiones separadas del compartimento somato-dendrítico de cada cámara de microfluído en el microscopio Zeiss 800 a una magnificación de 20X. Luego, se utilizó la función manual de conteo celular del software ImageJ teniendo en cuenta los siguientes criterios: tamaño de los núcleos, presencia/ausencia de nucleolos y morfología del citoplasma (Figura 3). Por último, se normalizó el conteo de cada imagen en función del número total de núcleos.



**Figura 3. Criterios de identificación para el conteo de núcleos condensados.** Imagen del compartimento somato-dendrítico, adquirida en un microscopio Zeiss 800 a una magnificación de 20x. Barra de escala: 150  $\mu\text{m}$ . Las flechas rojas y amarillas indican neuronas en proceso de muerte celular con distinta morfología: por un lado, se observan neuronas con citoplasma “hinchado” y núcleos condensados y excéntricos (flechas rojas) y por el otro, neuronas con citoplasma condensado y núcleos más pequeños también condensados (flechas amarillas). En todas ellas se visualiza la ausencia de nucleolos.

#### 5.6. Análisis estadístico

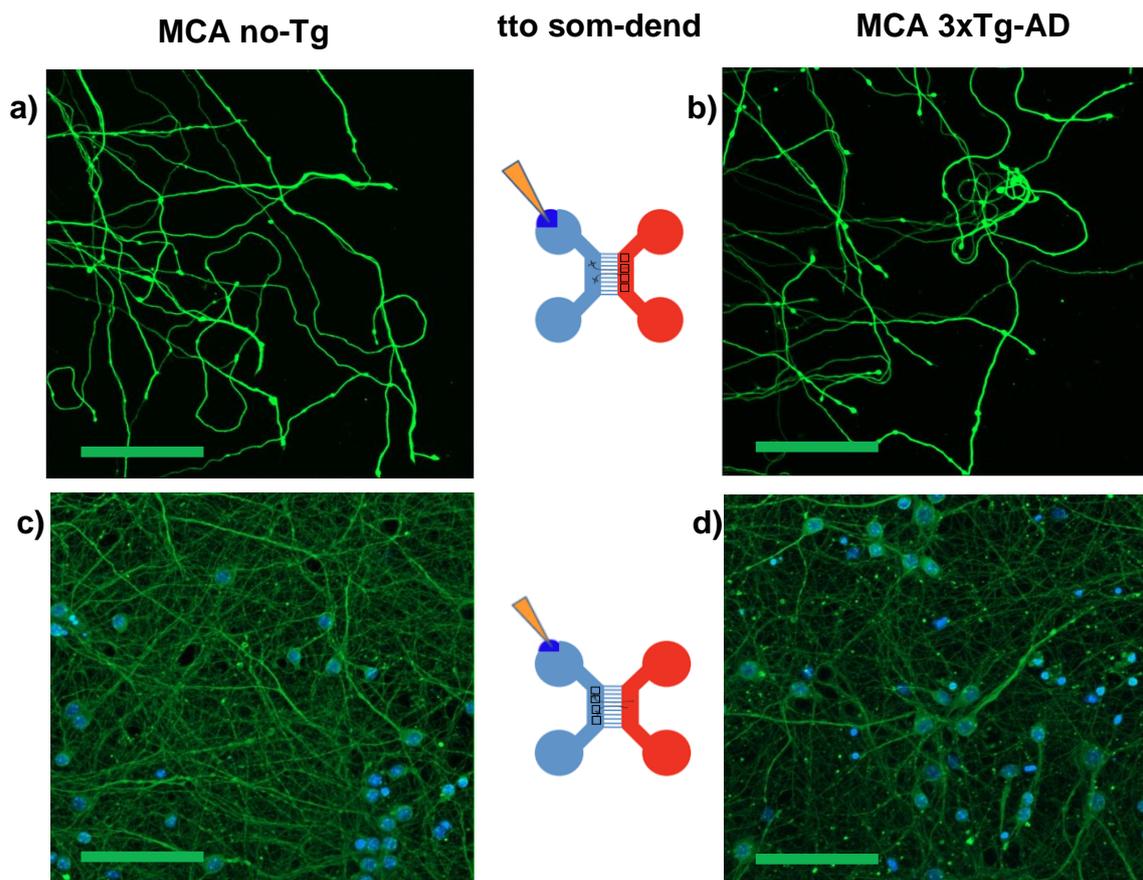
Los datos normalizados y expresados en porcentaje respecto al control (cultivo tratado con MCA no Tg) se promediaron para cada cámara y se analizaron mediante el Test de Student (t-Test). Los p valores menores a 0.05 se consideraron como diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Se analizaron los datos de 3 cultivos celulares independientes, con 2 réplicas por cada tratamiento en cada cultivo. Los datos se presentan como promedio +/- desvío estándar.

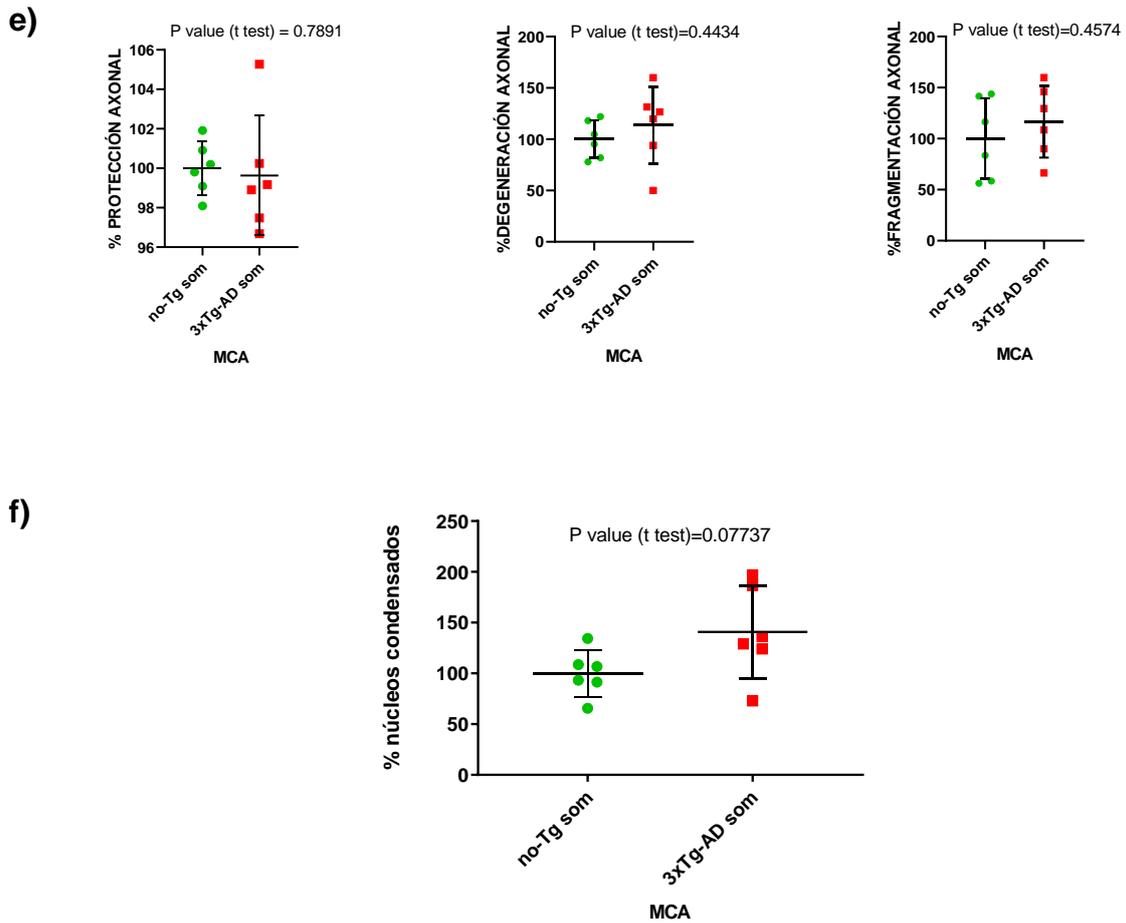
## 6. Resultados

A continuación, se analizan los principales resultados obtenidos a partir de los ensayos de inmunocitoquímica, luego de la exposición localizada por 24 hrs al MCA 3xTg-AD en diferentes compartimentos celulares (somato-dendrítico o axonal) y en diferentes estados de cultivo (7 o 12 DIV).

### 6.1. Tratamiento somato-dendrítico por 24 hrs con MCA 3xTg-AD en cultivos cortico/hipocampales de 7 DIV:

A pesar de que se observa una tendencia a un mayor índice de degeneración y fragmentación axonal y de cantidad de núcleos condensados en el tratamiento somato-dendrítico con medio condicionado 3xTg-AD (Figura 4), no se puede concluir que el tratamiento somato-dendrítico por 24 hrs con medio condicionado 3xTg-AD, a los 7 DIV, sea significativamente distinto al tratamiento control no-Tg.

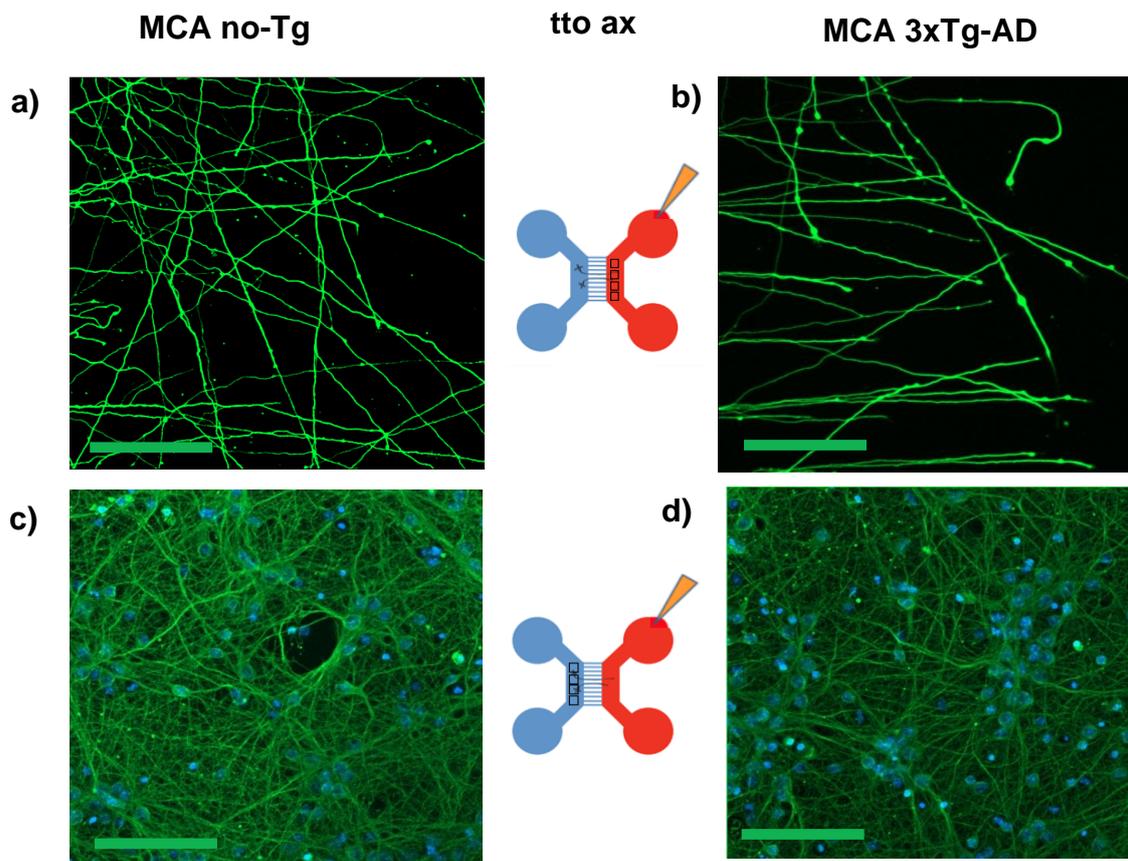


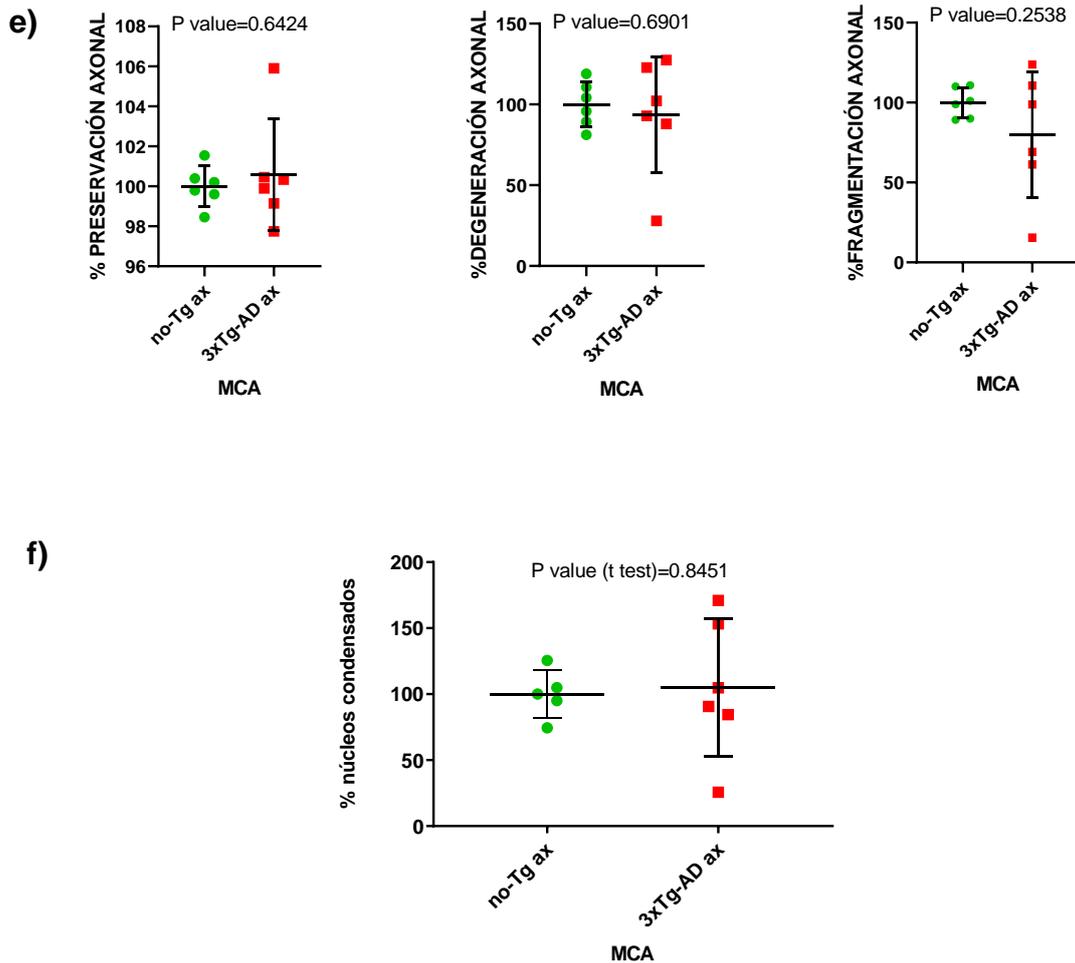


**Figura 4. Tratamiento somato-dendrítico por 24 hrs con MCA 3xTg-AD en cultivos cortico/hipocampales de 7 DIV. a-d)** Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia mostrando el estado de los diferentes compartimentos, axonal y somato-dendrítico, luego del tratamiento somato-dendrítico por 24 hrs con MCA no Tg (izquierda) y 3xTg-AD (derecha). Magnificación: 20X. Barra de escala: 150  $\mu$ m. Cada esquema central representa la localización del tratamiento en el dispositivo y de qué compartimento fueron tomadas las imágenes. **a)** Imagen tomada del compartimento axonal luego del tratamiento somato-dendrítico por 24 hrs con MCA no-Tg, **b)** Imagen tomada del compartimento axonal luego del tratamiento somato-dendrítico por 24 hrs con MCA 3xTg-AD. **c)** Imagen tomada del compartimento somato-dendrítico luego del tratamiento somato-dendrítico por 24 hrs con MCA no-Tg. **d)** Imagen tomada del compartimento somato-dendrítico luego del tratamiento somato-dendrítico por 24 hrs con MCA 3xTg-AD. **e)** Índice de preservación, degeneración, y fragmentación axonal luego del tratamiento somato-dendrítico por 24 hrs con MCA no-Tg vs 3xTg-AD **f)** Cuantificación de núcleos condensados luego del tratamiento somato-dendrítico por 24 hrs con MCA no-Tg vs 3xTg-AD. Los datos referentes a los índices de preservación, degeneración y fragmentación axonal y del conteo de núcleos se obtuvieron como se indica en la metodología (n = 5-6; t-test P < 0.05).

**6.2. Tratamiento axonal por 24 hrs con MCA 3xTg-AD en cultivos cortico/hipocampales de 7 DIV:**

A pesar de que se observa una tendencia a un menor índice de degeneración y fragmentación axonal en el tratamiento axonal con medio condicionado 3xTg-AD (Figura 5), no se puede concluir que a los 7 DIV el tratamiento axonal por 24 hrs con medio condicionado 3xTg-AD sea significativamente distinto al tratamiento control no-Tg.

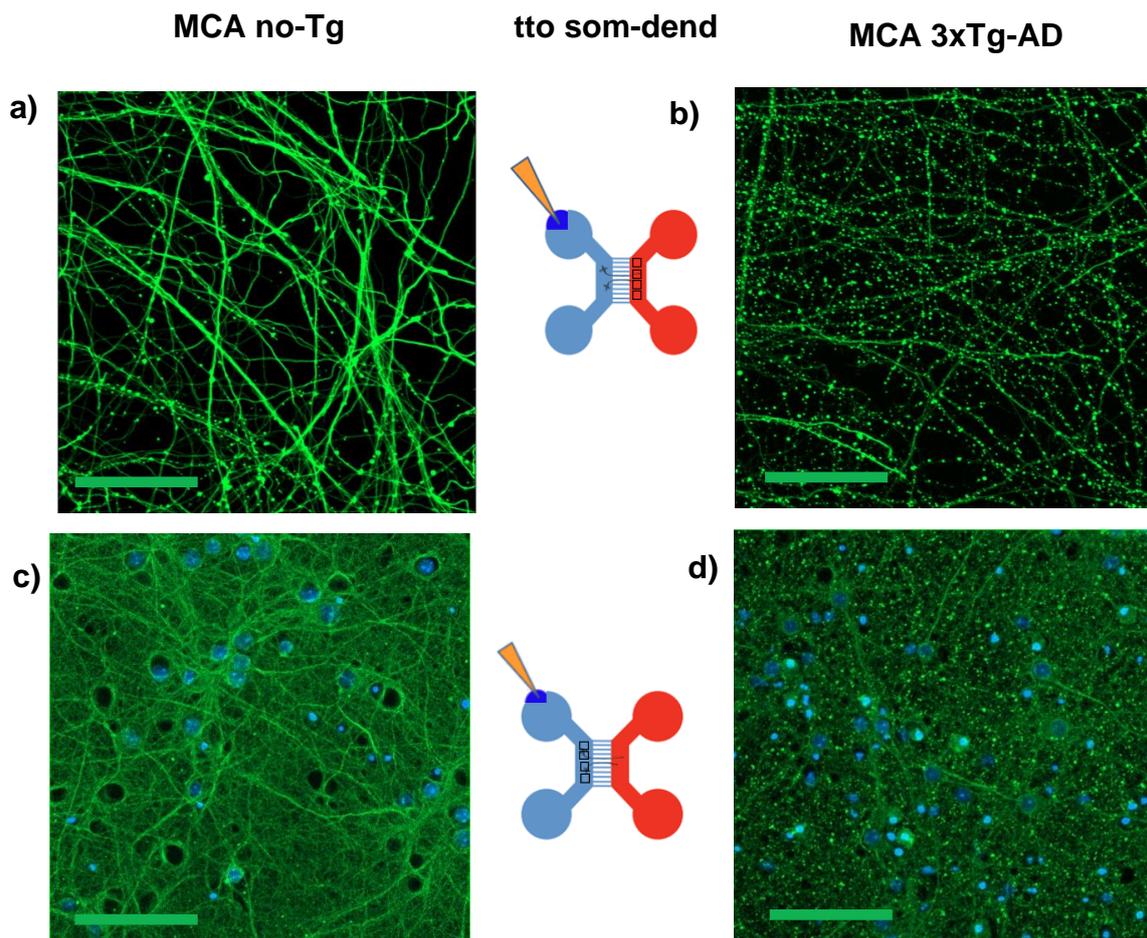


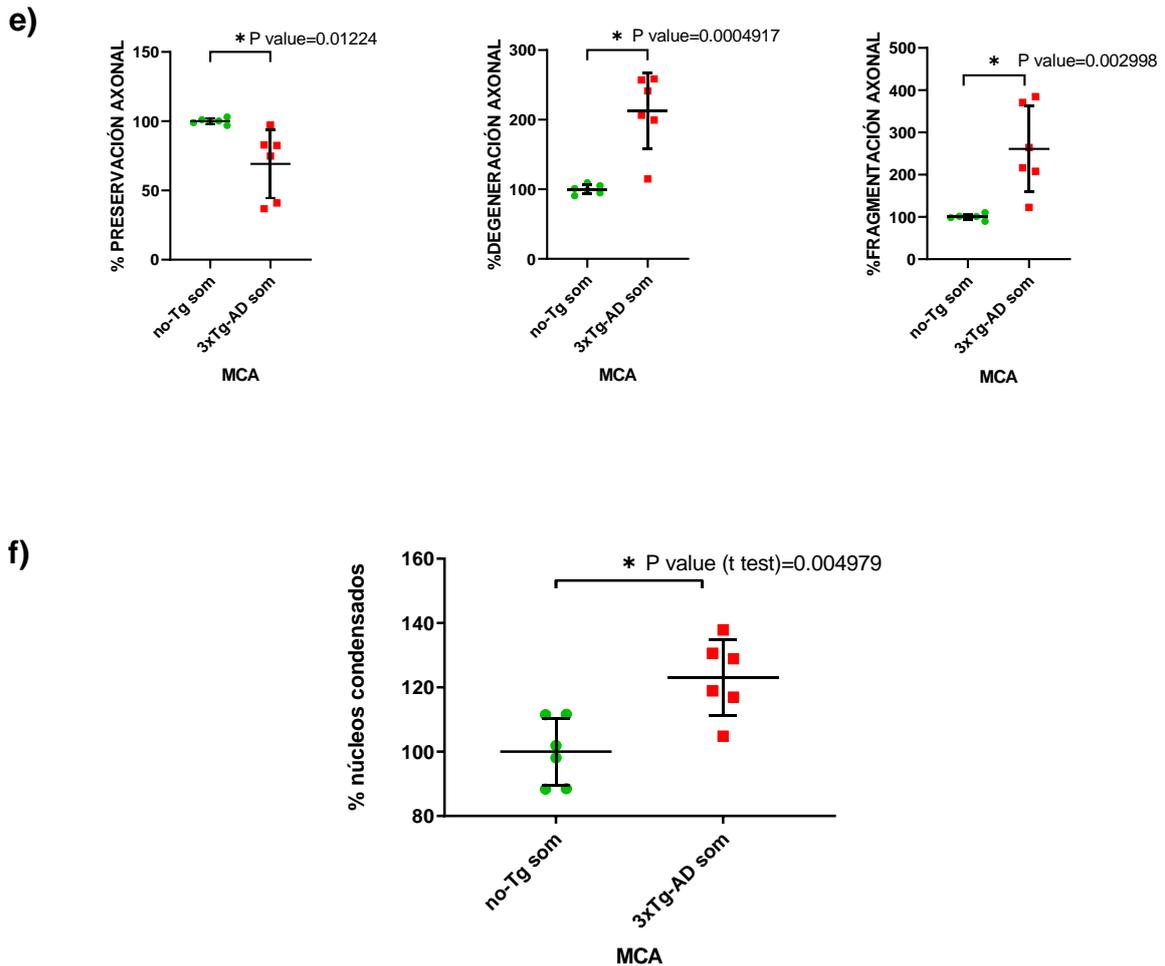


**Figura 5: Tratamiento axonal por 24 hrs con MCA 3xTg-AD en cultivos cortico/hipocampales de 7 DIV. a-d)** Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia mostrando el estado de los diferentes compartimentos, axonal y somato-dendrítico, luego del tratamiento axonal por 24 hrs con MCA no Tg (izquierda) y 3xTg-AD (derecha). Magnificación: 20X. Barra de escala: 150  $\mu$ m. Cada esquema central representa la localización del tratamiento en el dispositivo y de qué compartimento fueron tomadas las imágenes. **a)** Imagen tomada del compartimento axonal luego del tratamiento axonal por 24 hrs con MCA no-Tg, **b)** Imagen tomada del compartimento axonal luego del tratamiento axonal por 24 hrs con MCA 3xTg-AD. **c)** Imagen tomada del compartimento somato-dendrítico luego del tratamiento axonal por 24 hrs con MCA no-Tg. **d)** Imagen tomada del compartimento somato-dendrítico luego del tratamiento axonal por 24 hrs con MCA 3xTg-AD. **e)** Índice de preservación, degeneración, y fragmentación axonal luego del tratamiento axonal por 24 hrs con MCA no-Tg vs 3xTg-AD **f)** Cuantificación de núcleos condensados luego del tratamiento axonal por 24 hrs con MCA no-Tg vs 3xTg-AD. Los datos referentes a los índices de preservación, degeneración y fragmentación axonal y del conteo de núcleos se obtuvieron como se indica en la metodología (n = 5-6; t-test P < 0.05).

### 6.3. Tratamiento somato-dendrítico por 24 hrs con MCA 3xTg-AD en cultivos cortico/hipocampales de 12 DIV:

El análisis de las imágenes obtenidas, tanto del lado somato-dendrítico como del lado axonal, reveló que el tratamiento somato-dendrítico por 24 hrs con MCA 3xTg-AD tiene un efecto neurotóxico en cultivos de 12 DIV. Se observa una diferencia significativa con respecto al control (no-Tg), tanto en la degeneración y fragmentación axonal distal como en la muerte neuronal (Figura 6).

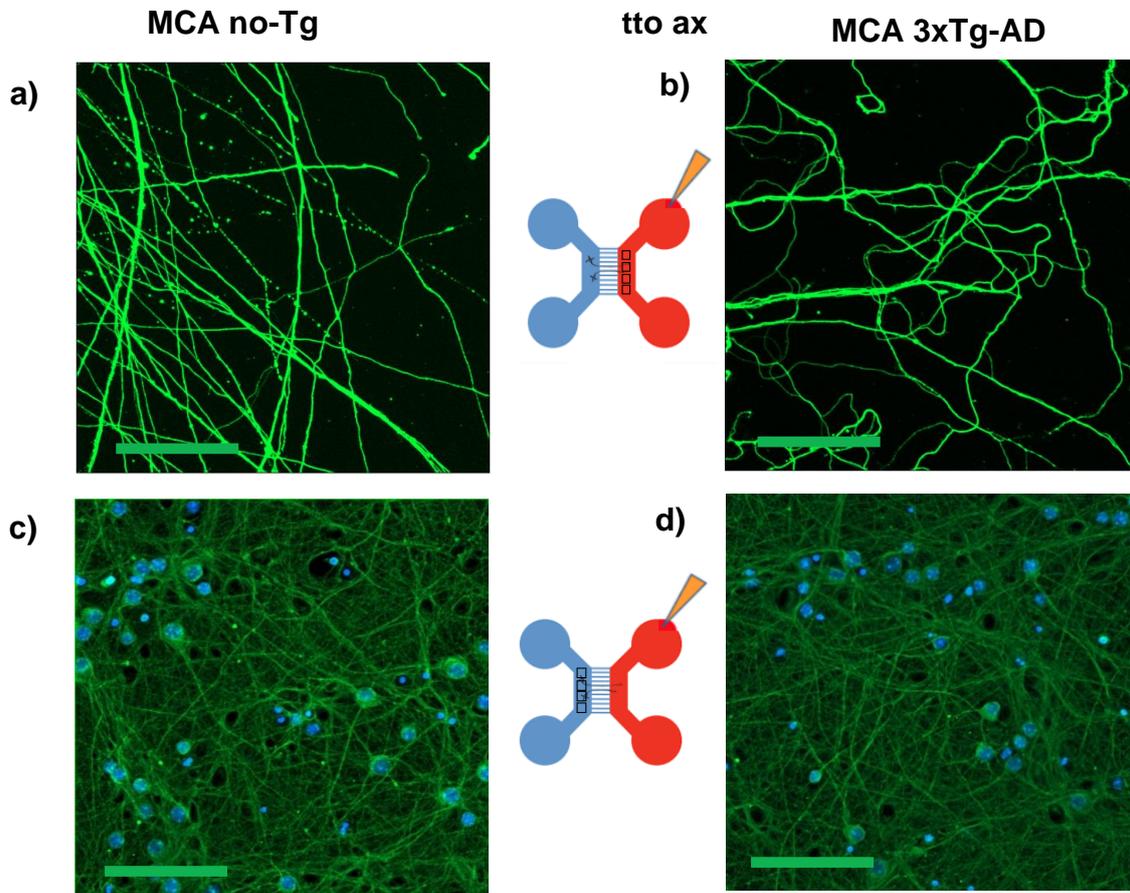


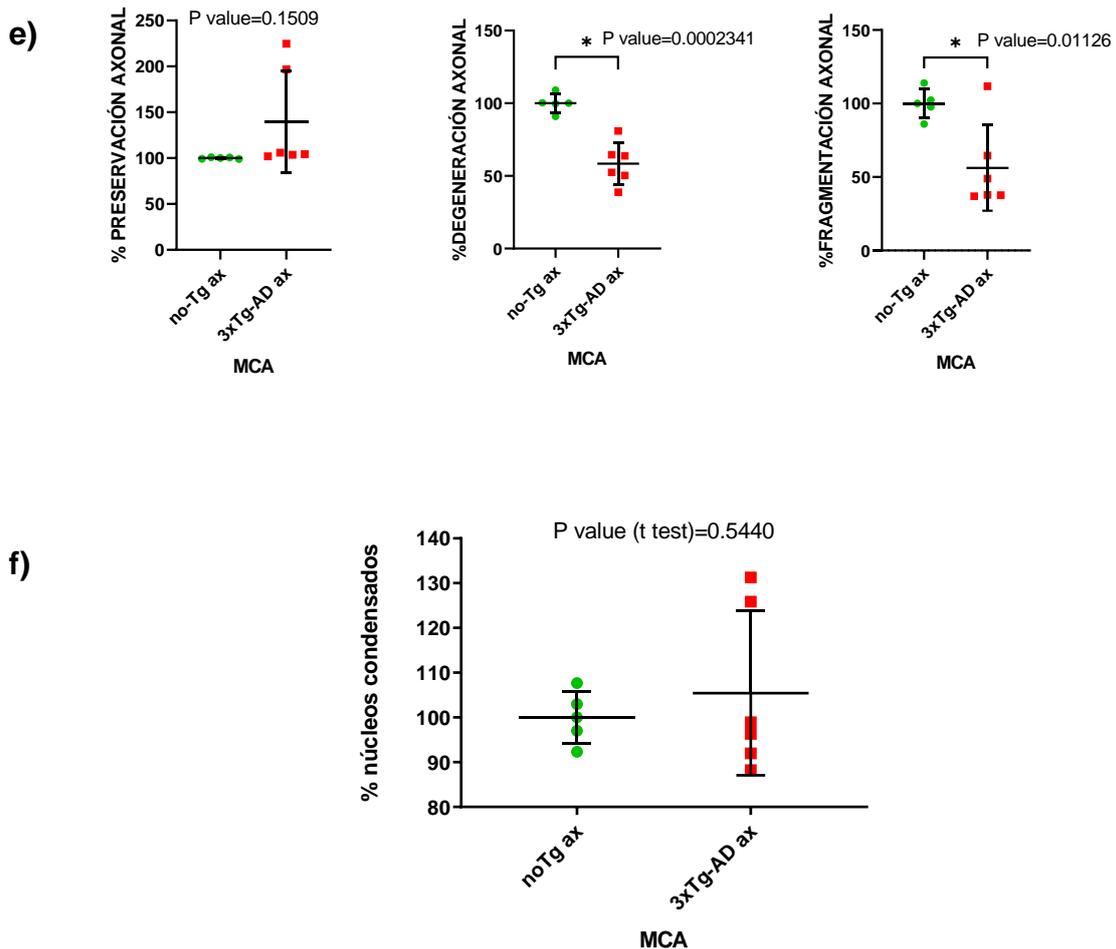


**Figura 6. Tratamiento somato-dendrítico por 24 hrs con MCA 3xTg-AD en cultivos cortico/hipocampales de 12 DIV. a-d)** Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia mostrando el estado de los diferentes compartimentos, somato-dendrítico y axonal, luego del tratamiento somato-dendrítico por 24 hrs con MCA no Tg (izquierda) y 3xTg-AD (derecha). Magnificación: 20X. Barra de escala: 150  $\mu$ m. Cada esquema central representa la localización del tratamiento en el dispositivo y de qué compartimento fueron tomadas las imágenes. **a)** Imagen tomada del compartimento axonal luego del tratamiento somato-dendrítico por 24 hrs con MCA no-Tg, **b)** Imagen tomada del compartimento axonal luego del tratamiento somato-dendrítico por 24 hrs con MCA 3xTg-AD. **c)** Imagen tomada del compartimento somato-dendrítico luego del tratamiento somato-dendrítico por 24 hrs con MCA no-Tg. **d)** Imagen tomada del compartimento somato-dendrítico luego del tratamiento somato-dendrítico por 24 hrs con MCA 3xTg-AD. **e)** Índice de preservación, degeneración, y fragmentación axonal luego del tratamiento somato-dendrítico por 24 hrs con MCA no-Tg vs 3xTg-AD **f)** Cuantificación de núcleos condensados luego del tratamiento somato-dendrítico por 24 hrs con MCA no-Tg vs 3xTg-AD. Los datos referentes a los índices de preservación, degeneración y fragmentación axonal y del conteo de núcleos se obtuvieron como se indica en la metodología (n = 5-6; t-test P < 0.05).

#### 6.4. Tratamiento axonal por 24 hrs con MCA 3xTg-AD en cultivos cortico/hipocampales de 12-13 DIV:

El tratamiento axonal por 24 hrs con MCA 3xTg-AD en cultivos de 12 DIV no indujo ningún proceso neurodegenerativo. Por el contrario, dicho tratamiento muestra un menor índice de degeneración y fragmentación axonal que el control (no-Tg) (Figura 7).





**Figura 7: Tratamiento axonal por 24 hrs con MCA 3xTg-AD en cultivos cortico/hipocampales de 12 DIV. a-d)** Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia mostrando el estado de los diferentes compartimentos, somato-dendrítico y axonal, luego del tratamiento axonal por 24 hrs con MCA no Tg (izquierda) y 3xTg-AD (derecha). Magnificación: 20X. Barra de escala: 150  $\mu$ m. Cada esquema central representa la localización del tratamiento en el dispositivo y de qué compartimento fueron tomadas las imágenes. **a)** Imagen tomada del compartimento axonal luego del tratamiento axonal por 24 hrs con MCA no-Tg, **b)** Imagen tomada del compartimento axonal luego del tratamiento axonal por 24 hrs con MCA 3xTg-AD. **c)** Imagen tomada del compartimento somato-dendrítico luego del tratamiento axonal por 24 hrs con MCA no-Tg. **d)** Imagen tomada del compartimento somato-dendrítico luego del tratamiento axonal por 24 hrs con MCA 3xTg-AD. **e)** Índice de preservación, degeneración, y fragmentación axonal luego del tratamiento axonal por 24 hrs con MCA no-Tg vs 3xTg-AD **f)** Cuantificación de núcleos condensados luego del tratamiento axonal por 24 hrs con MCA no-Tg vs 3xTg-AD. Los datos referentes a los índices de preservación, degeneración y fragmentación axonal y del conteo de núcleos se obtuvieron como se indica en la metodología (n = 5-6; t-test P < 0.05).

## 7. Discusión

Utilizando el dispositivo de cámara de microfluído se propuso estudiar el efecto neurotóxico del MCA 3xTg-AD en los distintos subdominios celulares de la neurona, axón y soma-dendrita.

Según los resultados obtenidos, la exposición al MCA 3xTg-AD en la región somato-dendrítica de neuronas cortico-hipocampales de 12 DIV induce tanto muerte neuronal en el compartimento somato-dendrítico, como degeneración y fragmentación axonal en el compartimento axonal. En este escenario, el estímulo tóxico pudo haber tenido efecto inicial tanto a nivel somato-dendrítico como a nivel axonal proximal (región incluida en el compartimento somato-dendrítico de la cámara de microfluído) o también en ambas regiones al mismo tiempo, por lo que no se puede definir si la degeneración observada se inicia primero en uno u otro subdominio.

A su vez, luego de la exposición al MCA 3xTg-AD en la región somato-dendrítica de cultivos de 12 DIV, se observa que en el compartimento somato-dendrítico hay tanto neuronas con núcleo y citoplasma condensados como neuronas con núcleo condensado y citoplasma “hinchado” (Figura 3 y 6d). Una reciente revisión bibliográfica que trata la muerte de neuronas en la EA (Fricker *et al.*, 2018), menciona una característica morfológica degenerativa llamada “neuronas globo” que se asemeja mucho al fenotipo con citoplasma “hinchado” observado en las imágenes del compartimento somato-dendrítico (Figura 3 y 6d).

Esta característica morfológica esta descrita comúnmente en las tauopatías (Dickson *et al.*, 1986, Mimuro *et al.*, 2010, Mori *et al.*, 1996, Sakurai *et al.*, 2000, Togo y Dickson, 2002), incluida la EA (Aoki *et al.*, 2003, Fujino *et al.*, 2004, Shahani *et al.*, 2006). Las neuronas tau + se hinchan, típicamente el núcleo es excéntrico (Lowe *et al.*, 1992, Tolnay y Probst, 1998) y poseen neurofilamentos fosforilados (Dickson *et al.*, 1986). Fricker y colaboradores dan una posible explicación sobre la aparición de esta morfología neuronal: “las neuronas se hinchan debido al desbalance en la relación entre la tasa de acumulación de proteínas en el

soma, por la inhibición del transporte axonal, y la tasa de degradación de proteínas; esto aumenta la presión osmótica causando la entrada de agua a la célula” (Fricker *et al.*, 2018).

Aunque estos perfiles aparecen con cierta regularidad y están colocados estereotípicamente en las diferentes enfermedades, aún se desconoce el mecanismo molecular que hay por detrás. Para verificar que efectivamente se trate de este fenotipo neuronal, se debería utilizar un anticuerpo para marcar tau y/o neurofilamentos fosforilados.

Otra razón para la aparición de esta morfología puede ser por el proceso llamado cromatólisis que luego deriva en apoptosis. Esto ocurre, por ejemplo, cuando hay daño a nivel axonal próximo al soma. Si bien las cámaras de microfluído se utilizan para aislar los axones de la región somato-dendrítica, la parte más proximal de los axones queda del lado somato-dendrítico y es por eso que este mecanismo de muerte celular podría ser una opción para explicar este fenotipo.

Por otro lado, luego de la exposición al MCA 3xTg-AD en el compartimento axonal de cultivos de 12 DIV, se observa un menor índice de degeneración y fragmentación axonal en comparación al tratamiento control, sugiriendo un efecto trófico del MCA 3xTg-AD. Este resultado aparentemente contradictorio con respecto al tratamiento somato-dendrítico, puede deberse a que los astrocitos 3xTg-AD liberan moléculas tanto perjudiciales como beneficiosas para las neuronas, y que dependiendo en que dominio subcelular esté ejerciendo su efecto, va a tener diferente impacto en la neurona afectada.

También esta ambigüedad podría ser provocada por una misma molécula que tenga efectos opuestos según la expresión/localización de su blanco en los distintos dominios subcelulares (soma, dendritas y axón). Tal es el caso de NGF y particularmente su forma precursora (pro-NGF), que es la forma predominante de NGF en el cerebro y se incrementa significativamente en la EA (Sáez *et al.*, 2006). El NGF modula la supervivencia y diferenciación neuronal mediante la activación del receptor de tropomiosina quinasa TrkA, y del receptor de neurotrofina p75

(p75NTR). Por el contrario, el pro-NGF junto con el co-receptor de sortilina (SORT1) y el receptor de neurotrofina homólogo-2 (NRH2), pueden estimular el proceso de muerte celular por apoptosis mediante la activación de p75NTR (Mufson *et al.*, 2019).

Se ha demostrado que el NGF, o una especie relacionada con actividad apoptótica específica, es producido por astrocitos activados por A $\beta$  y desempeña un papel importante en la mediación de la pérdida de neuronas a través de la activación de p75NTR (Sáez *et al.*, 2006). La señalización de supervivencia o de apoptosis de NGF/pro-NGF depende de los cambios en la estequiometría de TrkA, p75NTR, la disponibilidad de co-receptores y el papel fisiológico de pro-NGF durante etapas tempranas en la EA (Mufson *et al.*, 2019). Cambiar el equilibrio de estos factores podría cambiar la respuesta que desencadenan NGF/pro-NGF en las neuronas durante la progresión de la EA. Si pro-NGF se une a p75NTR *in vivo* e induce apoptosis, sería crucial desarrollar fármacos que bloqueen la unión de pro-NGF a p75NTR. Por el contrario, si NGF y pro-NGF se unen a TrkA para inducir la supervivencia celular, el desarrollo de fármacos que mejoren esta interacción podría proporcionar neuroprotección en la EA (Mufson *et al.*, 2019).

Teniendo esto en cuenta, puede ser que en la región somato-dendrítica haya más densidad de p75NTR que de receptores TrkA, mientras que en la región axonal haya mayor densidad de receptores TrkA que de p75NTR. Por lo tanto, una misma molécula liberada por los astrocitos 3xTg-AD, como NGF/pro-NGF, induciría efectos diferenciales del lado axonal y del lado somato-dendrítico.

Finalmente, debido a que no se observó degeneración axonal ni muerte neuronal significativa en el tratamiento somato-dendrítico a los 7 DIV, pero sí se observaron ambos procesos frente al mismo tratamiento a los 12 DIV, se puede decir que el estado de madurez del cultivo incide en qué tan rápido se desencadena el proceso neurodegenerativo. Este fenómeno se podría explicar debido a que la cámara de microfluído es un formato que tiende a estresar más los cultivos en comparación con los

modelos convencionales de cultivo celular, y entonces a mayor DIV, puede haber mayor estrés celular y por lo tanto mayor sensibilidad al estímulo neurotóxico del medio condicionado.

Otra alternativa podría ser que los blancos celulares con los que interactúan los componentes tóxicos y tóxicos del MCA se expresen en etapas más maduras del cultivo, y por lo tanto los efectos no se observen en cultivos más jóvenes.

## **8. Principales conclusiones y perspectivas**

De este trabajo se puede concluir que, tal como se planteó en la primera hipótesis, existe un efecto diferencial por parte del MCA 3xTg-AD sobre los cultivos neuronales en cámaras de microfluído, con un efecto neurotóxico al realizar el tratamiento en el compartimento somato-dendrítico, y un efecto neurotrófico al realizar el tratamiento en el compartimento axonal. Este resultado sugiere que el MCA 3xTg-AD presenta una combinación de factores neurotóxicos y neurotróficos, y que posiblemente los blancos moleculares de estos factores se encuentren distribuidos de manera diferente en los distintos dominios de la neurona.

Una mayor comprensión del potencial de señalización combinatoria de la astrogliosis reactiva en la EA podría facilitar estrategias terapéuticas dirigidas que atenúen los aspectos potencialmente perjudiciales de este proceso. Asimismo, un estudio en mayor profundidad sobre las vías que se activan tanto a nivel somático como axonal en las neuronas frente a la exposición al MCA 3xTg-AD podría definir tanto el tipo de muerte celular como posibles targets terapéuticos.

Por otro lado, nuestra segunda hipótesis fue refutada ya que los resultados muestran que en el dispositivo de cámara de microfluído, la madurez del cultivo influye en el estado neurodegenerativo del mismo, observando mayor degeneración axonal y muerte neuronal en el tratamiento con MCA 3xTg-AD a los 12 DIV que a los 7 DIV. Esta característica del modelo podría verse como una limitante, pero, por el contrario, tal vez estudiando y comparando los perfiles génicos de las

neuronas en ambas condiciones se podría detectar vías de estrés o preservación celular y por ende buscar posibles targets para poder enlentecer el proceso neurodegenerativo.

## **9. Bibliografía**

Aoki, K., Uchihara, T., Nakamura, A., Komori, T., Arai, N., Mizutani, T., 2003. Expression of apolipoprotein E in ballooned neurons-comparative immunohistochemical study on neurodegenerative disorders and infarction. *Acta Neuropathol* 106: 436–440.

AUDAS (Asociación Uruguaya de Alzheimer y Similares), 2016. Plan Nacional de Demencias para la República Oriental del Uruguay. Propuesta de políticas públicas para promover y garantizar los Derechos Humanos de las personas con demencia y sus familiares en el país. Available at [https://www.audas.org.uy/06\\_Informacion/AUDAS\\_Plan\\_Nacional\\_Demencias-Presentacion\\_Publica.pdf](https://www.audas.org.uy/06_Informacion/AUDAS_Plan_Nacional_Demencias-Presentacion_Publica.pdf)

Ayyaz, A., Jasper, H., 2013. Intestinal inflammation and stem cell homeostasis in aging *Drosophila melanogaster*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3:98

Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., Jones, E., 2011. Alzheimer's disease. *Lancet* 377: 1019–1031

Barres, B.A., 2008. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 60:430–440

Barrientos, S. A., Martínez, N. W., Yoo, S., Jara, J. S., Zamorano, S., Hetz, C., Twiss, J.L., Alvarez, J., Court, F.A., 2011. Axonal degeneration is mediated by the mitochondrial permeability transition pore. *J. Neurosci.* 31, 966–978

Braak, H., Del Tredici, K., 2015. The preclinical phase of the pathological process underlying sporadic Alzheimer's disease. *Brain* 138: 2814–2833

Brady, S., Morfin, G., 2010. A perspective on neuronal cell death signaling

and neurodegeneration. *Molecular Neurobiology*, vol. 42,1:25-31

Calixto, A., Jara, J. S., Court, F. A., 2012. Diapause formation and downregulation of insulin-like signaling via DAF-16/FOXO delays axonal degeneration and neuronal loss. *PLoS Genet* 8: e1003141

Carrero, I., Gonzalo, M.R., Martin, B., Sanz-Anquela, J.M., Arevalo-Serrano, J., Gonzalo- Ruiz, A., 2012. Oligomers of beta-amyloid protein (A $\beta$ 1-42) induce the activation of cyclooxygenase-2 in astrocytes via an interaction with interleukin-1beta, tumour necrosis factor-alpha, and a nuclear factor kappa-B mechanism in the rat brain. *Exp. Neurol.* 236: 215–227

Dajas-Bailador, F., Bonev, B., Garcez, P., Stanley, P., Guillemot, F., Papalopulu, N., 2012. MicroRNA-9 regulates axon extension and branching by targeting Map1b in mouse cortical neurons. *Nature Neuroscience*, 15(5): 697–699

Deleglise, B., Magnifico, S., Duplus, E., Vaur, P., Soubeyre, V., Belle, M., Vignes, M., Viovy, J.L., Jacotot, E., Peyrin, J.M., Brugg, B., 2014.  $\beta$ -amyloid induces a dying-back process and remote trans-synaptic alterations in a microfluidic-based reconstructed neuronal network. *Acta Neuropathol Comm* 2, 145

Dickson, D.W., Yen, S.H., Suzuki, K.I., Davies, P., Garcia, J.H., Hirano, A., 1986. Ballooned neurons in select neurodegenerative diseases contain phosphorylated neurofilament epitopes. *Acta Neuropathol* 71: 216–223

Du, H., Guo, L., Fang, F., Chen, D., Sosunov, A. A., McKhann, G. M., Yan, Y., Wang, C., Zhang, H., Molkenin, J.D., Gunn-Moore, F.J., Vonsattel, J.P., Arancio, O., Chen, J.X., Yan, S.D., 2008. Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 14:1097–1105.

Fricke, M., Tolkovsky, A. M., Borutaite, V., Coleman, M., y Brown, G. C., 2018. Neuronal Cell Death. *Physiological reviews*, 98(2): 813–880.

Fujino, Y., Delucia, M.W., Davies, P., Dickson, D.W., 2004. Ballooned

neurons in the limbic lobe are associated with Alzheimer type pathology and lack diagnostic specificity. *Neuropathol Appl Neurobiol* 30: 676–682.

Herrup, K., 2010. Re-imaging Alzheimer's disease - an age-based hypothesis, *Journal of Neuroscience* 30(50):16755–16762.

Hosie, K. A., King, A. E., Blizzard, C. A., Vickers, J. C., Dickson, T. C., 2012. Chronic excitotoxin-induced axon degeneration in a compartmented neuronal culture model. *ASN Neuro* Feb 23;4(1)

Karin, M., Clevers, H., 2016. Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration. *Nature* 529: 307–315

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239–257

Kincaid, E., 2016. Picture imperfect: going beyond imaging amyloid in Alzheimer's disease. *Nat Med* 22: 1067–1068

Kins, S., Lauther, N., Szodorai, A., Beyreuther, K., 2006. Subcellular trafficking of the amyloid precursor protein gene family and its pathogenic role in Alzheimer's disease. *Neuro- degener Dis* 3: 218–226

Kneysberg, A., Collier, T. J., Manfredsson, F. P., Kanaan, N. M., 2016. Quantitative and semi-quantitative measurements of axonal degeneration in tissue and primary neuron cultures. *J. Neurosci. Methods* 266, 32–41

Kreisl, W.C., Lyoo, C.H., Liow, J.S., Wei, M., Snow, J., Page, E., Jenko, K.J., Morse, C.L., Zoghbi, S.S., Pike, V.W., Turner, R.S., Innis, R.B., 2016. (11)C-PBR28 binding to translocator protein increases with progression of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 44: 53–61

Li, X., Lei, P., Tuo, Q., Ayton, S., Li, Q.X., Moon, S., Volitakis, I., Liu, R., Masters, C.L., Finkelstein, D.I., Bush, A.I. 2015. Enduring Elevations of Hippocampal Amyloid Precursor Protein and Iron Are Features of  $\beta$ -Amyloid Toxicity and Are Mediated by Tau. *Neurotherapeutics* 12: 862–873

Lowe, J., Errington, D.R., Lennox, G., Pike, I., Spendllove, I., Landon, M., Mayer, R.J. 1992. Ballooned neurons in several neurodegenerative diseases and stroke contain alpha B crystallin. *Neuropathol Appl Neurobiol* 18: 341–350

Maragakis, N.J., Rothstein, J.D. 2006. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol* 2:679–689

Medeiros, R., LaFerla, F.M., 2013. Astrocytes: Conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. *Experimental Neurology*. Academic Press, 239:133–138

Millet, L.J., Gillette, M.U., 2012. New perspectives on neuronal development via microfluidic environments. *Trends Neurosci.* 35 (12):752-61

Mimuro, M., Yoshida, M., Miyao, S., Harada, T., Ishiguro, K., Hashizume, Y., 2010. Neuronal and glial tau pathology in early frontotemporal lobar degeneration-tau, Pick's disease subtype. *J Neurol Sci* 290: 177–182

Morfini, G.A., Burns, M., Binder, L. I., Kanaan, N. M., LaPointe, N., Bosco, D. A., Brown, R. H., Brown, H., Tiwari, A., Hayward, L., Edgar, J., Nave, K.-A., Garberrn, J., Atagi, Y., Song, Y., Pigino, G., Brady, S. T., 2009. Axonal transport defects in neurodegenerative diseases. *J. Neurosci.*, vol. 29, 41: 12776-86

Mori, H., Oda, M., Mizuno, Y., 1996. Cortical ballooned neurons in progressive supranuclear palsy. *Neurosci Lett* 209: 109–112

Mufson, E.J., Counts, S.E., Ginsberg, S.D., Mahady, L., Perez, S.E., Massa, S.M., Longo, F.M., Ikonovic, M.D., 2019. Nerve Growth Factor Pathobiology During the Progression of Alzheimer's Disease. *Front Neurosci* 13: 533

Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., LaFerla, F.M., 2003. Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular Abeta and Synaptic Dysfunction. *Neuron* 9(3):409-21

Ossenkoppele, R., Schonhaut, D.R., Schöll, M., Lockhart, S.N., Ayakta, N., Baker, S.L., O'Neil, J.P., Janabi, M., Lazaris, A., Cantwell, A., Vogel, J., Santos, M., Miller, Z.A., Bettcher, B.M., Vessel, K.A., Kramer, J.H., Gorno-Tempini, M.L., Miller, B.L., Jagust, W.J., Rabinovici, G.D., 2016. Tau PET patterns mirror clinical and neuroanatomical variability in Alzheimer's disease. *Brain* 139: 1551–1567

Patterson, C., 2018. World Alzheimer's report 2018. The state of the art of dementia research: New frontiers. Alzheimer Disease International, London. Available at <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2018.pdf> (2018). (Accessed: 03 July 2019)

Raff, M. C., Whitmore, A. V. and Finn, J. T., 2002. Neuroscience: Axonal self-destruction and neurodegeneration', *Science*, 296(5569): 868–871

Rajendran, L., Annaert, W., 2012. Membrane trafficking pathways in Alzheimer's disease. *Traffic* 13: 759–770

Sáez, E, T., Pehar, M., Vargas, M.R., Barbeito, L., Maccioni, R.B., 2006. Production of Nerve Growth Factor by  $\beta$ -Amyloid-Stimulated Astrocytes Induces p75NTR-Dependent Tau Hyperphosphorylation in Cultured Hippocampal Neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 84:1098-1106

Sakurai, A., Okamoto, K., Fujita, Y., Nakazato, Y., Wakabayashi, K., Takahashi, H., Gonatas, N.K., 2000. Fragmentation of the Golgi apparatus of the ballooned neurons in patients with corticobasal degeneration and Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol* 100: 270– 274.

Salvadores, N., Sanhueza, M., Manque, P., Court, F., 2017. Axonal Degeneration during Aging and its Functional Role in Neurodegenerative Disorders. *Front. Neurosci.* 04 September 2017

Shahani, N., Subramaniam, S., Wolf, T., Tackenberg, C., Brandt, R., 2006. Tau aggregation and progressive neuronal degeneration in the absence of changes in spine density and morphology after targeted expression of Alzheimer's disease-relevant tau constructs in organotypic hippocampal

slices. *J Neurosci* 26: 6103–6114

Smith, I. F., Hitt, B., Green, K.N., Oddo, S., LaFerla, F.M., 2005. Enhanced caffeine-induced Ca<sup>2+</sup> release in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease', *Journal of Neurochemistry* 94(6): 1711–1718

Sofroniew, M. V., 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in neurosciences* 32(12):638–47

Spillantini, M.G., Goedert, M., 2013. Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet Neurol* 12: 609–622

Taylor, A. M., Blurton-Jones, M., Rhee, S.W., Cribbs, D.H., Cotman, C.W., Jeon, N.L., 2005. A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nat Methods* 2(8): 99-605

Togo, T., Dickson, D.W., 2002. Ballooned neurons in progressive supranuclear palsy are usually due to concurrent argyrophilic grain disease. *Acta Neuropathol* 104: 53–56

Tolnay, M., Probst, A., 1998. Ballooned neurons expressing alphaB-crystallin as a constant feature of the amygdala in argyrophilic grain disease. *Neurosci Lett* 246: 165–168

Villegas, R., Martinez, N. W., Lillo, J., Pihan, P., Hernandez, D., Twiss, J. L., Court, F.A., 2014. Calcium release from intra-axonal endoplasmic reticulum leads to axon degeneration through mitochondrial dysfunction. *J. Neurosci.* 34:7179–7189

Wang, Y., Balaji, V., Kaniyappan, S., Krüger, L., Irsen, S., Tepper, K., Chandupatla, R., Maetzler, W., Schneider, A., Mandelkow, E., Mandelkow, E., 2017. The release and trans-synaptic transmission of Tau via exosomes. *Mol Neurodegener.* 12:5.

Winblad, B., Amouyel, P., Andrieu, S., Ballard, C., Brayne, C., Brodaty, H., Cedazo-Minguez, A., Dubois, B., Edvardsson, D., Feldman, H., Fratiglioni, L., Frisoni, G.B., Gauthier, S., Georges, J., Graff, C., Iqbal, K., Jessen, F., Johansson, G., Jönsson, L., Kivipelto, M., Knapp, M., Mangialasche, F., Melis, R., Nordberg, A., Rikkert, M.O., Qiu,

C., Sakmar, T.P., Scheltens, P., Schneider, L.S., Sperling, R., Tjernberg, L.O., Waldemar, G., Wimo, A., Zetterberg, H., 2016. Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European science and society. *The Lancet. Neurology*. Elsevier 15(5):455–532

Zempel, H., Luedtke, J., Kumar, Y., Biernat, J., Dawson, H., Mandelkow, E., Mandelkow, E.M., 2013. Amyloid- $\beta$  oligomers induce synaptic damage via Tau-dependent microtubule severing by TTL6 and spastin. *EMBO J* 32: 2920–2937