



---

---

**Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**

**Escuela de Biología**

**El extracto hidroalcohólico de *Malva parviflora* ejerce un efecto inmunomodulador sobre células microglía en un modelo murino de la Enfermedad de Alzheimer**

**Tesis**

**Que para obtener el grado de:**

**Licenciada en Biología**

**Presenta:**

**Elisa Medrano Jiménez**

**Director de Tesis:**

**Dra. Leonor Pérez Martínez  
Instituto de Biotecnología, UNAM  
Depto. Medicina Molecular y Bioprocesos**

**Puebla, Puebla**

**Agosto, 2016**

**Son mis decisiones las que me han traído hasta aquí...** 

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Neuroinmunobiología (NIB) del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, Morelos), bajo la tutoría de la Dra. Leonor Pérez Martínez. Este proyecto se realizó gracias al financiamiento de DGAPA-UNAM y CONACYT.

## **Agradecimientos**

A todos los profesores de la Escuela de Biología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por brindarme la oportunidad de aprender biología e inspirarme a seguirme preparándome profesionalmente.

Al Instituto de Biotecnología de la UNAM, por permitirme ser parte de esta maravillosa comunidad.

Quiero agradecer a todas las personas que han contribuido directa o indirectamente en la elaboración de este trabajo y que me han acompañado a lo largo de este camino.

A la Dra. Leonor Pérez Martínez y al Dr. Gustavo Pedraza por permitirme ser parte de su laboratorio y darme la oportunidad de trabajar en un proyecto de investigación. Pero principalmente, quiero agradecer a la Dra. Leonor por guiarme, apoyarme, por su paciencia, por ser parte de mi formación y enseñanzas. Muchas Gracias.

Quiero agradecer a la M. en C. Adriana Ramírez Vargas y al M. en C. Héctor Julio García Flores, por su accesibilidad y tiempo para la revisión de tesis. Gracias por las recomendaciones para enriquecer la escritura de la tesis.

A mi familia por el apoyo y cariño incondicional que siempre me ha dado. En especial a mis padres Manuel y Candida, por todas las oportunidades que me han brindado y por siempre estar ahí cuando los necesito. Gracias a ustedes he llegado hasta aquí, haciendo lo que más me gusta y me apasiona. A mis hermanas Mayra y Alondra, por nunca dejarme caer y siempre apoyarme. A mis tíos, principalmente a mi tío Gregorio y Dulce, gracias por creer en mí. Gracias por todo los amo demasiado.

A mi abuelita Carmen Amilpa, gracias abuelita por enseñarme que siempre se puede lograr las metas que uno se propone.

A Gaby por estar siempre ahí y escucharme, por tu apoyo incondicional y tu motivación. Durante la carrera fuiste la amiga incondicional y a pesar de nuestros problemas siempre nos acompañamos y nos motivamos para lograr nuestras metas. Te quiero mucho Gabriela.

A Mony y Lore por su amistad, por apoyarme y escucharme, por motivarme a seguir adelante siempre. Gracias las quiero mucho.

A mis amig@s y compañer@s de la carrera que estuvieron desde el inicio y los que a lo largo de la carrera se fueron incorporando, a ti Ana Lilia muchas gracias por esos momentos de risas, locuras y ánimos. A Susana, Ana María, Ana Karen, Uriel, Bianca, Alejandro Espinosa, Maritza y Viri. Gracias por todos los momentos que pasamos juntos.

A Karla, Ángel, Angélica, Sol y Jonathan, porque además de ser unos excelentes compañeros del laboratorio han sido grandes amigos, por animarme, motivarme y apoyarme siempre.

Quiero agradecer a Nohemí, por compartir sus conocimientos, por su paciencia para enseñarme todas las cosas de cultivo y más, por ser una gran persona conmigo, por el apoyo, por escucharme y brindarme un consejo.

Quiero agradecer a la Dra. Martha, por estar siempre ahí y escucharme, por el apoyo incondicional, por su paciencia y ayudar a culminar este proyecto.

Quiero agradecer a Oswaldo, por el apoyo técnico y por siempre que necesito ayuda está ahí para apoyarme. Gracias a ti puede realizar los experimentos de fagocitosis.

Quiero agradecer a Lourdes y César, que ayudaron directamente en la elaboración de este proyecto. En general quiero agradecer a todos los miembros del NIB a Nilda, Alejandro Costet, Azucena, Rafa, Eunice, Jorge, Erick, Tomas y demás NIB's . Gracias por todos los buenos momentos.

A todos muchas gracias.

# Índice

<b>Lista de abreviaturas</b> .....	1
<b>Índice de Figuras y Tablas</b> .....	4
<b>Resumen</b> .....	6
<b>I. Introducción</b> .....	7
I.1 Respuesta Inmune en el Sistema Nervioso Central.....	7
I.2 Microglía .....	9
I.3 Enfermedad de Alzheimer.....	13
I.4 Papel de la Microglía en la Enfermedad de Alzheimer .....	13
1.5 Mecanismo de fagocitosis del péptido $\beta$ A.....	15
<b>II. Antecedentes</b> .....	17
II.1 Uso de principios activos con propiedades anti-inflamatorias.....	17
II.2 Uso del Extracto Hidroalcohólico de <i>Malva parviflora</i> en la Enfermedad de Alzheimer .....	18
<b>III. Justificación y planteamiento del problema</b> .....	20
<b>IV. Hipótesis</b> .....	21
<b>V. Objetivos</b> .....	21
V.1 Objetivo General.....	21
V.2 Objetivos Particulares.....	21
<b>VI. Materiales y Métodos</b> .....	22
VI.1 Reactivos.....	22
VI.2 Determinación de la liberación de fosfatasa alcalina en células Raw Blue.....	22
VI.3 Cultivo Primario .....	23
VI.4 Determinación de activación de células de la microglía .....	25
VI.5 Ensayos de Fagocitosis.....	26
VI.6 Animales.....	27
VI.7 Análisis estadístico .....	29
<b>VII. Resultados</b> .....	30
VII.1 Aislamiento del cultivo primario de microglía y caracterización .....	30

VII.2 Activación de la microglía ante un estímulo pro-inflamatorio.....	32
VII.3 El Extracto Hidroalcohólico de <i>Malva parviflora</i> atenúa la activación de NF- $\kappa$ B/AP1 en macrófagos Raw Blue .....	33
VII.4 El Extracto Hidroalcohólico de <i>Malva parviflora</i> disminuye la morfología ameboide de células de la microglía .....	35
VII.5 El Extracto Hidroalcohólico de <i>Malva parviflora</i> aumenta la capacidad fagocítica de macrófagos peritoneales y microglía .....	37
VII.6 El Extracto Hidroalcohólico de <i>Malva parviflora</i> aumenta la capacidad fagocítica de las células de la microglía de Ratones modelo de la enfermedad de Alzheimer 5xFAD .....	41
VII.7 El Extracto Hidroalcohólico de <i>Malva parviflora</i> disminuye al fenotipo M1 en células de la microglía de ratones 5xFAD .....	44
<b>VIII. Discusión</b> .....	47
<b>IX. Conclusiones</b> .....	51
<b>X. Perspectivas</b> .....	52
<b>XI. Anexos</b> .....	54
XI.1. Generación del Extracto Hidroalcohólico de <i>Malva parviflora</i> .....	54
XI.2. Cultivo Primario .....	54
XI.3. Caracterización del Cultivo .....	56
XI.4. Inmunofluorescencia de tejido .....	57
<b>Referencias</b> .....	59

## Lista de abreviaturas

$\alpha$ S.- Alfa sinucleína

$\beta$ A.- Beta Amiloide

$\mu$ l.- Microlitos

5xFAD.- Enfermedad de Alzheimer Familiar, del inglés, 5x Familial Alzheimer's Disease

ADI.- Enfermedad de Alzheimer Internacional, del inglés Alzheimer's Disease International

AINE.- Anti-inflamatorios no esteroideos

AP-1.-Proteína activadora 1, del inglés Activator protein 1

APP.- Proteína precursora amiloide, del inglés Amyloid precursor protein

ARG1.-Arginasa 1

ASC.- Proteína asociada con la apoptosis que contiene un dominio de reclutamiento terminal carboxilo, del inglés apoptosis-associated speck-like protein containing a carboxy-terminal CARD

BDNF. – Factor neurotrófico derivado del cerebro, del inglés Brain derived neurotrophic factor

BHE. - Barrera Hematoencefálica

CARD.- Dominio de reclutamiento, del inglés recruitment domain

CFT  $\beta$ .- Fragmento C terminal  $\beta$

CR1.- Receptor del complemento 1, del inglés Complement receptor 1

DAMPs. – Patrones moleculares asociados a daño, del inglés Danger associated molecular Patterns

DAPI.- Del inglés, 4', 6-diamidino-2-phenylindole

E8.- día embrionario 8

EA.- Enfermedad de Alzheimer

EHA de *M. parviflora*.- Extracto Hidroalcohólico de *Malva parviflora*

f $\beta$ A.- fibrillas  $\beta$ A

FBS.- Suero Fetal Bovino

Hrs.- Horas

HTT.-Huntingtina mutante

IGF1. – Factor de crecimiento insulítico tipo 1, del inglés Insulin-like Growth Factor 1

IL1- $\beta$ .- Interleucina 1 beta

IL-4.- Interleucina 4



IL-6.- Interleucina 6

IL-10.- Interleucina 10

IDE.- Enzima degradante de insulina, del inglés Insulin-degrading enzyme

IKK.- Quinasa I $\kappa$ B, del inglés I $\kappa$ B Kinase

INF- $\gamma$ .- Interferón-gamma

iNOS.- Óxido nítrico sintetasa inducible

IRAKs.- Quinasas asociadas a receptores de interleucinas, del inglés Interleukins receptor-associated kinase

IRF5.- Factor 5 regulador del interferón, del inglés Interferon regulatory factor 5

LPS.- Lipopolisacárido

M1.- Clásico o Pro-inflamatorio

M2.- Alternativo o Anti-inflamatorio

M2b.- Inmunoregulador

M2c.- Desactivación adquirida

MG. – Microglía

Min.- Minutos

MYD88.- gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88, del inglés Myeloid differentiation primary response gene 88

Nef.- Neurofilamento

NEMO.- Modulador esencial de NF- $\kappa$ B, del inglés NF- $\kappa$ B essential modulator

NEP.- Neprilisina

NF- $\kappa$ B. - Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de células B activadas, del inglés Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NLR.- Receptor tipo NOD, del inglés, NOD-like receptors

NO.- Óxido nítrico, del inglés Nitric oxide

PAMP. – Patrones moleculares asociados a patógenos, del inglés Pathogen-associated molecular patterns

PRR. – Receptores con patrones de reconocimiento, del inglés Pattern recognition receptor

PS1.- Presenelina 1

PS2.- Presenelina 2

SEAP.- Fosfatasa alcalina embrionaria, del inglés Secreted embryonic alkaline phosphatase

SI.-Sistema Inmune

SNC.-Sistema Nervioso Central

TA.- Temperatura ambiente

TAK1.- Factor de crecimiento transformante beta-activado por quinasa 1, del inglés Transforming growth factor beta-activated kinase 1

TIR.- Receptor de interleucina, del inglés Toll-Interleukin receptor

TLR. – Receptores tipo Toll-Like, del inglés Toll-like receptor

TNF $\alpha$ .- Factor de necrosis tumoral alfa, del inglés Tumor necrosis factor alfa

TRAF6.- Factor asociado al receptor de TNF, del inglés TNF receptor-associated factor 6

TREM2. – Activación del receptor expresado en células mieloides 2, del inglés Triggering receptor expressed on myeloid cells 2

## Índice de Figuras y Tablas

	Titulo	Pagina
Figura 1	Diversidad de fenotipos de la microglía	10
Figura 2	Activación de la microglía por el $\beta$ A	14
Figura 3	Metodología utilizada para cultivo primario de microglía	24
Figura 4	Metodología utilizada para el experimento <i>in vivo</i>	28
Figura 5	Caracterización del cultivo primario de microglía de ratones neonatos CD1 y adultos 5xFAD	31
Figura 6	Activación del cultivo primario de microglía	32
Figura 7	Efecto del EHA de <i>M. parviflora</i> sobre la activación de NF- $\kappa$ B/AP-1 en macrófagos estimulados con LPS	34
Figura 8	Efecto del EHA de <i>M. parviflora</i> sobre la activación de cultivos primarios de microglía estimulados con LPS	36
Figura 9	Efecto del EHA de <i>M. parviflora</i> sobre la capacidad fagocítica de cultivos primarios de macrófagos peritoneales	38
Figura 10	Efecto del EHA de <i>M. parviflora</i> sobre la capacidad fagocítica de cultivos primarios de microglía de ratones neonatos CD1	39
Figura 11	El EHA de <i>M. parviflora</i> promueve la ramificación de células de la microglía	40
Figura 12	Efecto del EHA de <i>M. parviflora</i> sobre la capacidad fagocítica de cultivos primarios de microglía de ratones silvestres y 5xFAD de ocho y diez meses de edad	43
Figura 13	Efecto del EHA de <i>M. parviflora</i> sobre células de la microglía de ratones 5xFAD	45
Figura 14	Efecto del EHA de <i>M. parviflora</i> sobre los fenotipos de la microglía	46
Figura 15	Programa de termociclador	56
Tabla 1	Mezcla de reacción para RT	56

Tabla 2	Mezcla de reacción para PCR	56
Tabla 3	Programas de termociclador para los diferentes oligos utilizados	56
Tabla 4	Soluciones para inmunofluorescencias	58

## Resumen

La Enfermedad de Alzheimer (EA), es un desorden neurodegenerativo progresivo, caracterizado por la pérdida de neuronas y déficit cognitivo. Estudios recientes han reportado que la respuesta inflamatoria mediada por células inmunes, juega un papel central en la progresión de la EA. La microglía son células inmunes muy dinámicas que juegan un papel importante en el desarrollo, la homeostasis y en la respuesta inflamatoria en el Sistema Nervioso Central. Por otro lado, existe evidencia de la sobre-activación de las células de la microglía en la EA, en este estado la microglía libera mediadores inflamatorios como: citocinas, quimiocinas, especies reactivas de oxígeno (ERO's) entre otros, que inducen una respuesta neuroinflamatoria y por consiguiente promueven la patogénesis de la EA. Por lo que se ha propuesto como estrategia terapéutica el uso de principios activos con propiedades anti-inflamatorias que ayuden a inhibir la activación de las células de la microglía, y pueda ayudar a atenuar el desarrollo de la EA. En el presente trabajo nos centramos en evaluar el efecto anti-inflamatorio del extracto hidroalcohólico de *Malva parviflora* (EHA *M. parviflora*) sobre células de la microglía de ratón. Las células de la microglía fueron obtenidas a partir de dos cepas de ratón diferentes, CD1 tipo-silvestre y el modelo de la EA 5xFAD. En este trabajo se demostró que el EHA *M. parviflora* posee una propiedad inmunomoduladora, ya que disminuye significativamente la activación de NF- $\kappa$ B y AP-1 en macrófagos estimulados con LPS. También observamos su efecto anti-inflamatorio del EHA *M. parviflora* en células de la microglía de ratones neonatos, al disminuir el fenotipo ameboide que está asociado a su "activación" cuando son tratadas con LPS. Adicionalmente el EHA *M. parviflora* disminuye los niveles del marcador pro-inflamatorio CD86 en células de la microglía en ratones 5xFAD. Adicionalmente, el EHA *M. parviflora* induce significativamente la capacidad fagocítica de células de la microglía lo cual correlaciona con una disminución en la deposición del péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A) en corteza de ratones 5xFAD.

Palabras clave: Microglía, Inflamación, Fagocitosis, Enfermedad de Alzheimer, *Malva parviflora*,

# I. Introducción

## I.1 Respuesta Inmune en el Sistema Nervioso Central

El Sistema Inmune (SI), es el sistema encargado de proteger al organismo de invasores nocivos, tóxicos y sustancias químicas que se encuentran en el ambiente, también participa en la eliminación de restos celulares y patógenos. Mientras, que el Sistema Nervioso Central (SNC), es el sistema más complejo del cuerpo y está formado de tejidos, órganos y diferentes tipos de células, que secretan moléculas que permite interactuar de manera dinámica y compleja con el sistema inmune, esta interacción entre el SI y el SNC, permite proporcionar una defensa específica al cerebro (Blaylock, 2013).

La inflamación es una respuesta protectora, y puede ser iniciada por una infección de un patógeno (Akira *et al.*, 2006) o algún tipo de daño como lesión, trauma o disfunción celular (Chen y Nuñez, 2010). Las células inmunes involucradas en la respuesta inflamatoria son los macrófagos y las células dendríticas, y tienen en su superficie receptores de reconocimiento a patrones (PRRs, por sus siglas en inglés), estos receptores son responsables de detectar la presencia de patógenos a través del reconocimiento de estructuras conservadas entre especies de patógenos, que se denominan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés). Por otra parte, existe evidencia que los PRRs también reconocen moléculas endógenas que son liberadas por células dañadas, esto a través de patrones moleculares asociados al daño (DAMPs, por sus siglas en inglés) (Takeuchi y Akira, 2010).

Los PRRs, son responsables de regular el proceso inflamatorio y han sido clasificados en cuatro familias que incluyen: receptores transmembranales tipo Toll-like (TLRs, por sus siglas en inglés) y receptores de lectina tipo C (CLRs, por sus siglas en inglés), así como receptores citoplasmáticos como receptores NOD-like (NLRs, por sus siglas en inglés) y receptores del gen inducible por ácido retinoico RIG-i-like (RLRs, por sus siglas en inglés)

En ambas situaciones: infección o daño, los PRRs son los encargados de iniciar la cascada de señalización intracelular que conducen a la activación de factores de transcripción como: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de células

B (NF- $\kappa$ B, por sus siglas en inglés) e inicia la expresión de citocinas pro-inflamatorias como interleucina 6 (IL-6) y Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que coordinan la eliminación de los patógenos e inician la reparación del tejido dañado. Por ejemplo el receptor TLR4 reconoce ligandos como lipopolisacáridos (LPS), que forman parte de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. El receptor TLR4 recluta a proteínas adaptadoras que contienen dominios TIR, como el factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88), posteriormente se forma un complejo con IRAKs, TRAF6 y IRF-5, posteriormente se activa el complejo TAK1 lo que provoca la fosforilación de NEMO y la activación del complejo IKK. Finalmente NF- $\kappa$ B se transloca al núcleo e inicia la expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 y TNF- $\alpha$ . Adicionalmente, TAK1 también activa a proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs, por sus siglas en inglés), y finalmente las MAPKs activan al factor de transcripción proteína activadora 1 (AP-1, por sus siglas en inglés), que también induce la expresión de citocinas como IL-1 y TNF- $\alpha$ , lo que promueve la eliminación del patógeno y las células infectadas (Akira *et al.*, 2006; Takeuchi y Akira, 2010). Durante muchas décadas se considerado al cerebro como un tejido inmuno-privilegiado, donde solo se podría producir inflamación a través de una infección directa o después de la ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE), y la posterior infiltración de células inmunes periféricas (Heneka *et al.*, 2014). Se sabe que neuronas, células endoteliales, astrocitos, oligodendrocitos y microglía (MG) expresan en su superficie PRRs, lo que permite que estas células estén involucradas en la respuesta inflamatoria en el cerebro.

La Neuroinflamación es una respuesta inmune en el sistema nervioso central (SNC), contra estímulos perjudiciales como patógenos, niveles de estrés crónico, restos celulares (Singhal *et al.*, 2014). Los PRRs, son expresados principalmente por células gliales como microglía, astrocitos y oligodendrocitos.

En los últimos años se ha propuesto que proteínas mal plegadas como el péptido beta amiloide ( $\beta$ A), alfa sinucleína ( $\alpha$ S) y huntingtina mutante (HTT), pueden ser reconocidas por DAMPs y desencadenar una respuesta inflamatoria (Heneka *et al.*, 2014). Por ejemplo, las proteínas anteriormente mencionadas provocan la activación de receptores NLRs, que conduce al ensamblaje de un complejo proteico llamado inflamasoma y por

consiguiente la activación de caspasa 1 y la liberación de interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) (Franchi *et al.*, 2009).

Específicamente en la microglía el receptor NLRP3 es activado por el péptido  $\beta$ A, su activación provoca el reclutamiento de una proteína adaptadora ASC, que contiene el dominio CARD para la activación de caspasa 1 y esto lleva a la maduración y liberación IL-1 $\beta$  e interleucina 18 (IL-18) (Halle *et al.*, 2008; Singhal *et al.*, 2014), provocando la respuesta inflamatoria en el cerebro. En los últimos años, se ha reportado que la neuroinflamación es un factor importante en varias enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (Hirsch *et al.*, 2012), Huntington (Möller, 2010), Esclerosis múltiple (Frohman *et al.*, 2006) y la Enfermedad de Alzheimer (EA) (Hoozemans *et al.*, 2006).

Las células de la microglía representan el principal tipo de células inmunes en el cerebro y son las células principales que contribuyen a la neuroinflamación en la EA (Heneka *et al.*, 2014, 2015a). Por lo anterior, este trabajo se centró en su importancia en el proceso inflamatorio de la EA.

A continuación, se describirá que son las células de la microglía, su diversidad, así como su importancia y su contribución en la neuroinflamación en la EA.

## **I.2 Microglía**

Las células de la microglía son células inmunes que residen en el SNC constituyen aproximadamente entre el 5-20% del total de células gliales en roedores pero este porcentaje puede variar de acuerdo a la región del cerebro (Lawson *et al.*, 1990). Durante el desarrollo embrionario del ratón en el día ocho (E8), en el saco vitelino se originan células precursoras eritomiélicas que darán origen a la microglía, posteriormente se infiltran al cerebro en el E10 (Kierdorf *et al.*, 2013) y se establecen en el cerebro en el E12.

Las células de la microglía tienen importantes funciones en la regulación de la respuesta inmune (Hanisch y Kettenmann, 2007) y en la homeostasis (Streit, 2002). Como célula inmune la microglía cumple diversas funciones dentro de las cuales destacan: la

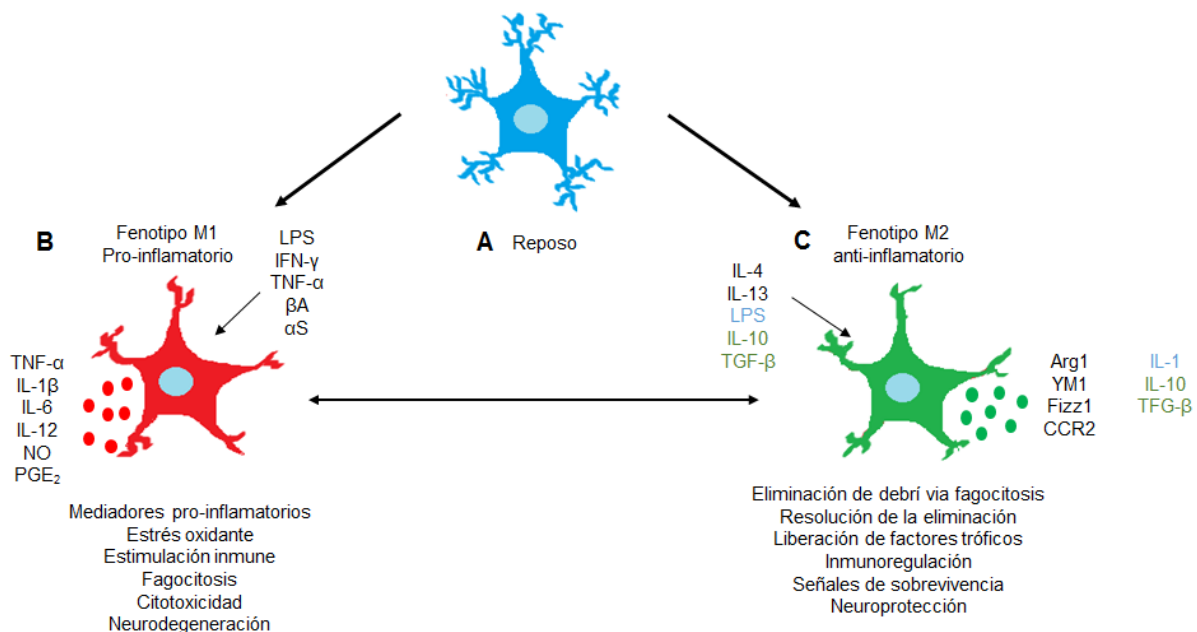


presentación de antígeno, fagocitosis, quimiotaxis y la producción de citocinas (Michell-Robinson *et al.*, 2015; Nayak *et al.*, 2014; Takahashi *et al.*, 2005). Las células de la microglía, también cumplen con funciones relacionadas al mantenimiento y la remodelación de la sinapsis, a través de un proceso llamado poda sináptica: que consiste en eliminar las conexiones sinápticas menos utilizadas y reforzar y mantener las más usadas (Hong *et al.*, 2016; Paolicelli *et al.*, 2011), esto a través de la activación de componentes del complemento (Cq1-C3). Se ha reportado que C1q y C3 se encuentran localizadas en sinapsis inmaduras (Stevens *et al.*, 2007). Adicionalmente, un estudio demostró que la microglía fagocita las entradas presinápticas y que esto depende de la actividad neuronal y la vía de señalización específica del receptor 3 del complemento CR3 y C3 (Schafer *et al.*, 2012).

En el cerebro adulto sano, la microglía exhibe una morfología “Ramificada” con un soma pequeño y finos procesos celulares, esta morfología se ha asociado a un estado de “Reposo” y se puede estar determinado por niveles bajos de varias moléculas como: el complejo de histocompatibilidad MHC de clase II, moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 y CD40 (Ponomarev *et al.*, 2005). Sin embargo, existen estudios que han reportado que la microglía no está en completo reposo, ya que tiene periodos intermitentes de alta motilidad que están intercalados con pausas estáticas, permitiendo así la función de explorar su microambiente, por medio de la extensión y retracción de sus extensos y numerosos procesos (Davalos *et al.*, 2005; Nimmerjahn *et al.*, 2005; Raivich, 2005).

Por otra parte, la microglía es la primera línea de defensa del cerebro y responde rápidamente a un estímulo como por ejemplo la infiltración de un patógeno en el interior del cerebro. Se sabe que es “Activada” en presencia de una infección, trauma, isquemia, enfermedad neurodegenerativa o en la alteración en la actividad neuronal. El proceso de activación de la microglía es complejo, ya que provoca cambios rápidos y profundos en la célula, morfológicamente adquiere una apariencia “Ameboide”, a través de la pérdida de sus procesos y aumento de tamaño, además de provocar cambios en su expresión génica y comportamiento funcional (Hanisch y Kettenmann, 2007; Huh *et al.*, 2003; Kreutzberg, 1996).

El proceso de activación, le permite adquirir a la microglía diversos fenotipos en respuesta al estímulo recibido. La diversidad de fenotipos de la microglía aún sigue siendo un debate. Sin embargo hasta este momento se han descrito diversos estados de activación: clásico (M1) con propiedades pro-inflamatorias y el estado de activación anti-inflamatorio (M2). Adicionalmente existen evidencias que el estado M2 puede dividirse en subpoblaciones: alternativo (M2a), inmunoregulador (M2b) y desactivación adquirida (M2c) (Hu *et al.*, 2015). Los diferentes estados de activación tienen características fisiológicas únicas ver Figura 1.



**Figura 1.-Diversidad de fenotipos de la microglía**

**A)** Microglía en reposo. **B)** Fenotipo pro-inflamatorio. **C)** Fenotipo anti-inflamatorio. Tomada y modificada de (Michell-Robinson *et al.*, 2015).

El estado de activación clásico, es inducido por compuestos microbianos como lipopolisacárido (LPS) (Mosser, 2003) o citocinas pro-inflamatorias como Interferón-gamma (INF- $\gamma$ ) (Schmid *et al.*, 2009), TNF $\alpha$  (Takeuchi *et al.*, 2006), IL1- $\beta$  (Meireles *et al.*, 2016), también se ha reportado que proteínas mal plegadas como el péptido  $\beta$ A y  $\alpha$ -sinucleína inducen la activación de células de la microglía (Codolo *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2005). El estado de activación M1, se caracteriza por la activación de vías de señalización involucradas en la respuesta inflamatoria como proteínas MAPK's,

(ERK1/2, p38, JNK) y factores de transcripción como AP-1 y NF- $\kappa$ B (Lee *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2012). La activación de estas vías de señalización, conduce a la expresión y liberación de diversos mediadores pro-inflamatorio como iNOS, COX2, MCP1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NO, PGE<sub>2</sub>, IL-6, IL-12 (Kim *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2008). Se ha reportado que la liberación de estos mediadores pro-inflamatorios pueden ser neurotóxicos, esto a través de provocar la muerte de neuronas (Kim *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2008).

Por el contrario, el estado M2 está asociado a la neuroprotección del SNC, ya que expresa citocinas y receptores que participan en la inhibición de la inflamación, la restauración de la homeostasis y en la capacidad fagocítica de células de la microglía (Cherry *et al.*, 2014). Por ejemplo, IL-4 e IL-13 inducen un fenotipo M2a (Freilich *et al.*, 2013; Lyons *et al.*, 2007). Estudios previos demostraron que IL-4 actúa a través del receptor de IL-4 (IL-4R) en macrófagos y puede promover la polarización a un fenotipo M2, a través de incrementar la expresión de Arginasa 1 (ARG 1) (Taylor *et al.*, 2005). Otro estudio en cultivos primarios de microglía, demostró que IL-4R induce la expresión de diferentes genes anti-inflamatorios como CD163, CD204 y CD206, adicionalmente se observó que el estímulo con IL-4R, incremento la fagocitosis de neuronas apoptóticas, y se correlaciona con un aumento en la expresión de receptores que participan en el proceso de fagocitosis como PPAR $\gamma$  y el receptor scavenger CD36 (Zhao *et al.*, 2015). Otros marcadores que se han descrito para el fenotipo M2a son YM1 y FIZZ 1 (Chhor *et al.*, 2013; Freilich *et al.*, 2013), estos marcadores están involucrados en la reparación del tejido, esto a través de la sanación de heridas (Colton y Wilcock, 2010).

Mientras el fenotipo M2c es inducido por IL-10 y TGF- $\beta$  (Elenkov y Chrousos, 2002). En un estudio con cultivos primarios de microglía y macrófagos, se demostró que el estímulo con IL-10 inhibe la expresión de CD40 y la activación del traductor de señal y activador de la transcripción-1 (STAT1, por sus siglas en inglés), adicionalmente se demostró que la inhibición de CD40 y STAT1 es a través de aumentar la expresión del supresor de la señalización por citocinas-3 (SOCS3, por sus sigla en inglés) (Qin *et al.*, 2006). Otras moléculas que se han descrito para el estado de activación M2c son receptores scavenger tipo A y B, CD14 y CCR2 (Mantovani *et al.*, 2004). El fenotipo M2b es el

menos estudiado, pero en macrófagos se sabe que puede ser inducido por la exposición de complejos inmunes como LPS o antagonistas de receptores TLRs y el receptor de IL-1 (IL-1R) (Mantovani *et al.*, 2004) y se caracteriza por un incremento en los niveles de IL-10 y bajos niveles de IL-12 (Mosser, 2003). También se ha observado que en cultivos primarios de microglía estimuladas con LPS, se incrementa la expresión de marcadores M2b como IL-1R e IL-10 (Chhor *et al.*, 2013).

Varios estudios, han observado que la microglía es activada por el péptido  $\beta$ A en la EA (Ghosh *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2012; Panicker *et al.*, 2015; Vargas *et al.*, 2005). Adicionalmente, se sabe que esta activación promueve la liberación de mediadores pro-inflamatorios que promueven la muerte de neuronas, por consiguiente esta respuesta inflamatoria exacerba la EA.

### **I.3 Enfermedad de Alzheimer**

La Enfermedad de Alzheimer es la causa principal de demencia más prevalente en todo el mundo (Querfurth y LaFerla, 2010). La asociación Internacional de la Enfermedad de Alzheimer, pronostica que en el 2015 había 46.8 millones de personas con demencia en todo el mundo. Este número se duplicara en 20 años en países subdesarrollados, debido a un incremento en la esperanza de vida, llegando a 74.7 millones en el 2030 y 131. 5 millones en el 2050.

La EA se caracteriza por la disminución progresiva de la función cognitiva (Minati *et al.*, 2009), provocada por dos marcas histopatológicas: la formación de placas seniles, cuyo componente proteico es el péptido  $\beta$ A en su forma insoluble y la deposición de ovillos neurofibrilares en el interior de las neuronas, que son acúmulos de proteína Tau hiperfosforilada (Busciglio *et al.*, 1995; Hardy y Allsop, 1991). También se ha reportado que el péptido  $\beta$ A provoca la activación de células de la microglía (Holtzman *et al.*, 2011), y por consiguiente provoca una respuesta neuroinflamatoria a través de la liberación de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 (Marcello *et al.*, 2008).

El péptido  $\beta$ A es generado a partir del procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloide (APP, por sus siglas en inglés). La APP es una proteína

transmembranal y se ha sugerido que podría participar como regulador de la sinapsis y plasticidad neuronal (Priller *et al.*, 2006; Turner *et al.*, 2003). Existen dos vías para el procesamiento proteolítico de la APP. La primera es la vía no amiloidogénica, en la cual participan las proteasas  $\alpha$  y  $\gamma$  secretasa. En esta vía la APP es cortada por la  $\alpha$ -secretasa generando un fragmento sAPP $\alpha$ . Un segundo fragmento generado por esta vía es el C-terminal de 83 residuos, el cual se ha denominado como C83, este fragmento pertenece unido a la membrana y posteriormente es procesado por la  $\gamma$ -secretasa, dando lugar a los péptidos AICD y p3, ambos son solubles y no forman agregados. La vía amiloidogénica es regulada por la actividad de  $\beta$ -secretasa, la cual realiza el primer corte dando lugar a un fragmento sAPP $\beta$ . El segundo fragmento C-terminal de 99 aminoácidos es procesado por la acción de la  $\gamma$ -secretasa originando los péptidos  $\beta$ A de 40 ( $\beta$ A40) y 42 ( $\beta$ A42) aminoácidos (Steiner *et al.*, 2000; Suh y Checler, 2002). Los péptidos  $\beta$ A42 son los menos solubles, forman oligómeros y fibrillas con ellos mismos o con otros péptidos y proteínas forman las placas seniles (Haass y Selkoe, 2007).

La Enfermedad de Alzheimer de tipo Familiar, se debe específicamente a mutaciones genéticas en tres de los genes involucrados en el procesamiento del péptido  $\beta$ A. Estas mutaciones involucran al gen de la proteína APP y los genes de las proteínas presenelina 1 (PS1) y presenelina 2 (PS2) (Bertram *et al.*, 2010; Lynn M. Bekris, Chang-En Yu, Thomas D. Bird, 2010). Se sabe que las personas que heredan la mutación en la APP o en la PS1, están garantizadas a desarrollar la EA, mientras que aquellos que heredaron la mutación en PS2, tienen un 95% de probabilidad para desarrollar la EA. Las personas que tienen cualquiera de estas tres mutaciones tienden a desarrollar los síntomas de la EA antes de los 65 años y en algunos casos a los 30 años, es decir desarrollan Alzheimer temprano. Pero la mayoría de los individuos desarrollan la enfermedad de aparición tardía que ocurre a los 65 años de edad o más tarde (Association Alzheimer's, 2015).

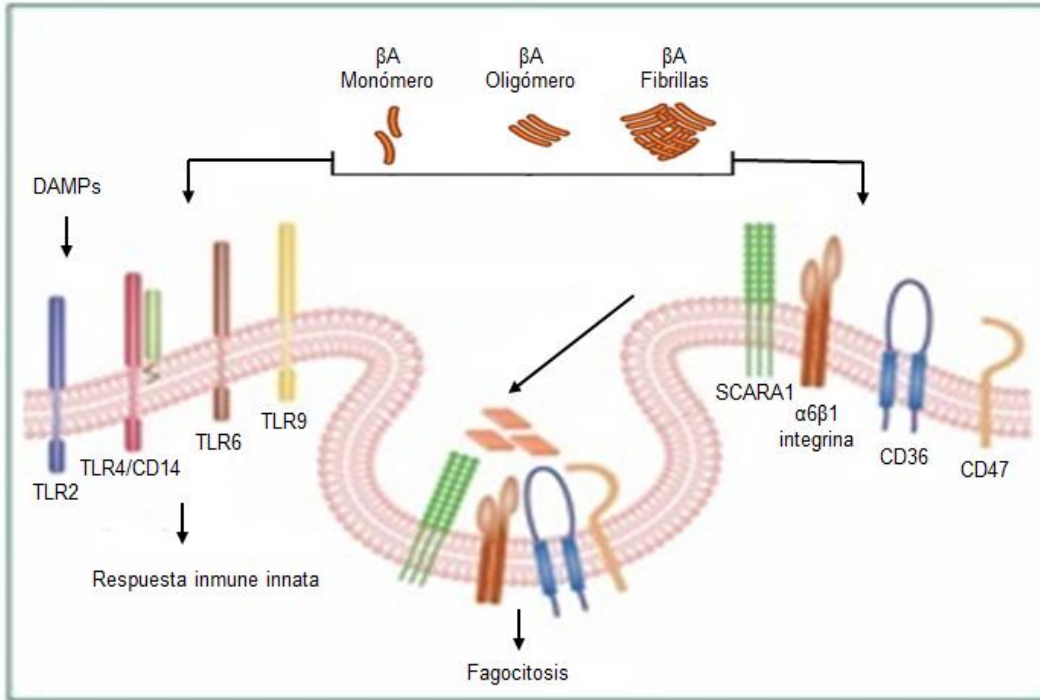
Sin embargo, aproximadamente el 1% de casos de la Enfermedad de Alzheimer es de tipo familiar. Mientras que los casos de la enfermedad de Alzheimer de tipo no familiar, es decir esporádico, depende de la combinación de factores genéticos y no genéticos por ejemplo el envejecimiento y obesidad (Tanzi, 2012). Por otra parte, en los últimos años, se ha reportado que la neuroinflamación mediada por la microglía contribuye al

desarrollo de la EA. (Haass y Selkoe, 2007; Marcello *et al.*, 2008). A continuación se describirá el papel de células de la microglía en la EA.

#### **I.4 Papel de la Microglía en la Enfermedad de Alzheimer**

La respuesta inflamatoria en la EA provoca cambios en la morfología de la microglía, es decir la microglía en reposo es activada por el péptido  $\beta$ A, lo que provoca un cambio a una morfología ameboide (Glass *et al.*, 2010). La activación de células de la microglía en la EA, ocurre a través de los receptores TLRs y NLRP3 (Fellner *et al.*, 2013; Jin *et al.*, 2008; Udan *et al.*, 2008). Los TLRs inician las cascadas de señalización intracelular que activan a factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y AP-1 (Takeuchi y Akira, 2010), su activación promueve la expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF- $\alpha$ . Por otra parte, se ha reportado que la MG podría montar un fenotipo neuroprotector al tratar de eliminar al péptido  $\beta$ A, a través del aumento de la fagocitosis y la degradación proteolítica del péptido (Tahara *et al.*, 2006a). Sin embargo, su activación constante promueve la neuroinflamación crónica, que es perjudicial para el cerebro, ya que la producción excesiva de citocinas pro-inflamatorias promueve la degeneración de las neuronas. Por ejemplo, la IL-1 $\beta$  interrumpe la formación de espinas dendríticas en neuronas, lo que provoca una deficiencia en la plasticidad sináptica y una disminución en la potenciación a largo plazo (LTP) (Tong *et al.*, 2012).

Las células de la microglía reconocen al péptido  $\beta$ A en sus diferentes formas; Oligómeros y fibrillas, a través de varios receptores de superficie como CD14, receptores scavenger clase A (SCARA1) y clase B CD36, CD47 y TLRs ( TLR2, TLR4, TLR6 y TLR9) (Bamberger *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005; Paresce *et al.*, 1996; Stewart *et al.*, 2010) ver figura 2. Por ejemplo, CD36 reconoce a Fibrillas de  $\beta$ A, posteriormente se induce la formación del heterodimero TLR4-TLR6, lo que provoca una cascada intracelular que provoca la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en células HEK293. Igualmente, el reconocimiento de las fibrillas  $\beta$ A por TLR4-TLR6 provoca la activación de las células de la microglía y la liberación de mediadores pro-inflamatorios como óxido nítrico (NO), especies reactivas de oxígeno (ROS) e IL-1 $\beta$  (Stewart *et al.*, 2010).



**Figura 2.- Activación de la microglía por el péptido  $\beta A$**

El péptido  $\beta A$  es censado por las células de la microglía, a través de receptores tipo Toll-like que se encuentran en la superficie y se desencadena la activación de la respuesta inmune, promoviendo la producción de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias. El péptido es internalizado por la microglía, por receptores Scavenger SCARA1, integrinas  $\alpha 6 \beta 1$ , CD36 y CD47. Tomada y modificada de (Heneka *et al.*, 2015a, 2015b)

La expresión de TLR4 está incrementada en cerebros humanos y en ratones modelos de la EA (Walter *et al.*, 2007). Por otra parte, se ha reportado que el péptido  $\beta A$  en células de la microglía induce la activación de NF- $\kappa B$  y por consiguiente la liberación de mediadores pro-inflamatorios como NO, IL-6 y TNF- $\alpha$ , y se han relacionado con la inducción de la muerte de neuronas (Chen *et al.*, 2005a). De igual manera la expresión de NF- $\kappa B$  está incrementada en un modelo de rata de EA (Jian *et al.*, 2015). Las células de la microglía también reconocen oligómeros  $\beta A$  a través del receptor scavenger SRA, causando la activación de p38 y NF- $\kappa B$  y por consiguiente la liberación de NO (Maezawa *et al.*, 2011).

Otro mecanismo involucrado en la respuesta inflamatoria de la EA es la activación del inflamasoma. La activación del inflamasoma NLRP3 en microglía es iniciada por la

fagocitosis del  $\beta$ A, lo que provoca el daño lisosomal e induce la liberación de catepsina B, y por consiguiente la activación del receptor citoplasmático NLRP3. Posteriormente, NLRP3 recluta a una proteína adaptadora ASC, posteriormente se induce la activación de caspasa-1 y la liberación de IL- $\beta$  (Halle *et al.*, 2008; Heneka *et al.*, 2013). Adicionalmente se observó que en cultivos primarios de microglía estimulados con el  $\beta$ A, se induce la expresión de mediadores pro-inflamatorias como NO, TNF- $\alpha$  y quimiocinas como CCL3, CCL4, CXCL2. Sin embargo, en cultivos primarios de microglía de ratones nulos para caspasa-1 que fueron estimulados con el  $\beta$ A, se observó una disminución en la liberación de los mediadores pro-inflamatorios anteriormente mencionados, esto correlaciona con una disminución en muerte de neuronas (Halle *et al.*, 2008). En adición, en ratones modelo para la EA (APP/PS1) que fueron cruzados con ratones deficientes del receptor NLRP3, se observó una disminución en la deposición del péptido  $\beta$ A y una mejora en su capacidad cognitiva (Heneka *et al.*, 2013).

Por otra parte, se ha reportado que la MG adquiere un fenotipo neuroprotector en la EA, a través de la fagocitosis y la degradación proteolítica del péptido  $\beta$ A (Tahara *et al.*, 2006b). También se ha reportado un aumento de la expresión de genes anti-inflamatorios (ARG1, MRC1 y YM1) en cerebros de pacientes y ratones modelo de la EA (Colton *et al.*, 2006). Estos genes anti-inflamatorios están asociados a la neuroprotección, por ejemplo ARG1 inhibe la regulación de NO (Corraliza *et al.*, 1995). Estos datos demuestran que existe una heterogeneidad funcional de fenotipos de la microglía pro-inflamatorio y anti-inflamatorio en la enfermedad de Alzheimer.

## **1.5 Mecanismo de fagocitosis del péptido $\beta$ A**

Una de las características de la EA es la producción anormal del péptido  $\beta$ A. Las células de la microglía son las encargadas de salvaguardar la integridad del SNC a través de diferentes mecanismos celulares y moleculares. Los mecanismos que utiliza para eliminar las diferentes formas del  $\beta$ A son: la fagocitosis, la autofagia y la endocitosis. Sin embargo, el deterioro de estas vías puede provocar la reducción del aclaramiento del péptido  $\beta$ A en la enfermedad de Alzheimer (Nixon *et al.*, 2005; Pickford *et al.*, 2015).



En etapas tempranas de la enfermedad la microglía elimina al  $\beta$ A por fagocitosis. Por ejemplo la eliminación de las fibras  $\beta$ A depende de la interacción de TLR2, TLR4 y CD14 (Reed-Geaghan *et al.*, 2009). Adicionalmente se ha reportado que el receptor SRA también participa en la fagocitosis de oligómeros  $\beta$ A (Yang *et al.*, 2011). El péptido  $\beta$ A entra a los fagolisosomas y posteriormente es degradado por proteasas como la catepsina B (Yang *et al.*, 2011), otras proteasa importantes son la neprilisina (NEP) y la enzima degradadora de insulina (IDE, por sus siglas en inglés) (Lee y Landreth, 2010). Sin embargo, cuando la respuesta inflamatoria es constante, puede causar un deterioro en la capacidad fagocítica de la microglía y por consiguiente su eliminación. Por lo anterior, hay un aumento en la deposición del  $\beta$ A en el cerebro. Esta idea es apoyada por un estudio donde se observa que en células de la microglía de ratones viejos PS1/APP de 14 meses, hay un aumento en la concentración de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , y hay una correlación con un decremento en la expresión de receptores que participan en la fagocitosis como SRA y CD36. Adicionalmente la línea celular N9 de microglía, que fue estimulada con TNF- $\alpha$  y decrece la expresión de SRA y CD36, y por consiguiente hay una reducción en la fagocitosis del  $\beta$ A (Hickman *et al.*, 2008).

Estos estudios en conjunto, sugieren que la crónica exposición de  $\beta$ A, quimiocinas y citocinas, son los responsables de la incapacidad de la microglía para fagocitar y eliminar al péptido  $\beta$ A. Adicionalmente se ha observado que al limitar la respuesta inflamatoria de células de la microglía, promueve su capacidad fagocítica (El-Shimy *et al.*, 2015) y por consiguiente adquiere un fenotipo protector.

## II. Antecedentes

Estudios epidemiológicos han demostrado que la neuroinflamación, es un factor contribuyente en la patogénesis de la EA. Adicionalmente el uso de drogas anti-inflamatorias no esteroideas, reducen el riesgo de desarrollar la EA (Breitner y Zandi, 2001). El péptido  $\beta$ A provoca la activación de la microglía vía pro-inflamatoria, que promueve un daño en el cerebro al producir moléculas citotóxicas. Por su importancia en el desarrollo de la enfermedad se ha propuesto a la microglía como blanco terapéutico. Por lo que contrarrestar su proceso inflamatorio o limitar su activación podría ayudar a atenuar la patología de la enfermedad de Alzheimer.

### II.1 Uso de principios activos con propiedades anti-inflamatorias

Muchos estudios experimentales han demostrado que el uso de compuestos anti-inflamatorios de origen sintético o natural, ayudan a atenuar el desarrollo de la EA a través de inhibir la activación de la microglía. Por ejemplo, se demostró que el uso de minociclina en ratones APP/PS1 inhibe la activación de la microglía en el hipocampo, así como la liberación de mediadores pro-inflamatorios como TNF- $\alpha$ , IL-6 e iNOS, además de mejorar el aprendizaje (Biscaro *et al.*, 2012). Adicionalmente un estudio, con cultivos primarios de microglía que fueron estimulados con LPS para inducir su activación, se demostró que minociclina es selectiva al inhibir el estado M1 de la microglía al disminuir la expresión de marcadores pro-inflamatorios como CD86, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Kobayashi *et al.*, 2013).

Por otra parte, estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo de dietas ricas en agentes anti-inflamatorios, que se encuentran en frutas y verduras, pueden disminuir el riesgo de desarrollar enfermedades neurodegenerativas como la EA (Gu *et al.*, 2010). También, se ha demostrado que la administración de extractos completos de plantas que contienen compuestos polifenólicos tienen efectos benéficos en modelos de la EA, por ejemplo, un estudio mostro que el extracto de *Rosa damascena* que fue administrado en ratas, que fueron inyectadas intraventricularmente con el péptido  $\beta$ A posee propiedades neuroprotectoras al mejorar el aprendizaje y la memoria de estos animales (Esfandiary *et al.*, 2015). Otro estudio mostro que el consumo del extracto de semillas de uvas, previene la deposición del péptido  $\beta$ A y la activación de células de la microglía en ratones

APP/PS (Wang *et al.*, 2009). Adicionalmente se ha reportado que compuestos aislados de frutas como  $\alpha$ -Iso-cubebene, pueden ayudar a atenuar la activación de células de la microglía provocada por el péptido  $\beta$ A, al disminuir la activación de vías pro-inflamatorias como NF-kB, JNK y p38 (Park *et al.*, 2013).

## **II.2 Uso del Extracto Hidroalcohólico de *Malva parviflora* en la Enfermedad de Alzheimer**

*Malva parviflora* (*M. parviflora*) es una especie vegetal y pertenece a la familia malvaceae (Shale *et al.*, 2005), de amplia distribución en México, y se ha usado en la medicina tradicional como desinflamante en la gastritis, para problemas del hígado, padecimientos del estómago y fiebre (Lorena., 2005). Estudios recientes han puesto en evidencia que extractos provenientes de *M. parviflora* poseen propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes y anti-microbianas (Shale *et al.*, 2005). De manera interesante, un estudio reciente mostro que un extracto etanólico administrado en ratones inyectados intraventricularmente con el péptido  $\beta$ A posee propiedades neuroprotectoras al mejorar la capacidad cognitiva de estos animales (Aslam y Sial, 2014).

Recientemente en el laboratorio se realizó y se caracterizó un extracto hidroalcohólico de *M. parviflora* (EHA de *M. parviflora*) y se determinó la presencia de compuestos polifénolicos, flavonoides, cumarina (escopoletina) y ácido oleanólico (Tesis de Maestría Itzia Jimenez Ferrer, 2012), en el anexo 1 se describe la metodología para la generación del EHA de *M. parviflora*.

Existen estudios epidemiológicos que asocian la presencia de diabetes tipo II, hipertensión arterial y obesidad, con un mayor riesgo de desarrollar la EA (Kivipelto *et al.*, 2005). Adicionalmente, estudios *in vivo* demuestran que la administración de una dieta alta en grasa exacerba la patología de la EA, a través de incrementar la deposición del péptido  $\beta$ A e incrementar citocinas pro-inflamatorias como (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) en el plasma (Refolo *et al.*, 2000). Otro estudio demostró que en el modelo APP23, que son alimentados con una dieta alta en grasa tienen un mayor déficit cognitivo (Takeda *et al.*, 2010).

Por lo anterior, en el laboratorio se propuso evaluar efecto farmacológico del EHA de *M. parviflora*, sobre la regulación de la neurodegeneración exacerbada por una inflamación provocada por la alimentación de una dieta alta en grasa (DAG) en un modelo murino de la EA (5xFAD), estos ratones coexpresan 5 mutaciones asociadas al desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer Familiar (5xFAD por sus siglas en inglés). Los ratones sobreexpresan la APP humana con tres mutaciones y dos en la presenelina 1. Ambos transgenes están regulados por el control transcripcional del promotor Thy1, que se expresa tejido-específico en el SNC. El EHA *M. parviflora* mostro tener un efecto benéfico al atenuar la progresión de la enfermedad de Alzheimer, ya que se observó la disminución del déficit cognitivo y de marcas histopatológicas de la enfermedad como: la deposición del péptido y astrogliosis (Tesis de Maestría Itzia Jimenez Ferrer, 2012).

### III. Justificación y planteamiento del problema

En los últimos años la incidencia de la EA, ha aumentado drásticamente. Varios grupos de investigación han identificado que la activación de las células de la microglía provoca la liberación de mediadores pro-inflamatorios, por consiguiente contribuye la EA. Por lo anterior, se ha propuesto que el uso de anti-inflamatorios no esteroides (AINE) puede inhibir su activación y por consiguiente atenuar el desarrollo de la EA. Sin embargo, estudios epidemiológicos han reportado que el uso crónico de AINE puede provocar el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Adicionalmente los ensayos clínicos con pacientes con la EA que han sido tratados con AINE no han sido exitosos. Por lo anterior, se ha tratado de desarrollar estrategias alternativas que sean eficaces y no provoquen efectos adversos.

Estudios epidemiológicos han reportado el potencial de dietas ricas en metabolitos secundarios con propiedades anti-inflamatorias como polifenoles y flavonoides, esto a través de ayudar a preservar la función cognitiva durante el envejecimiento y el riesgo de desarrollar la EA. Adicionalmente, se propuesto el uso de extractos de plantas que estén enriquecidos en metabolitos secundarios como alternativa para el tratamiento de la EA. Por lo que, resulta de interés utilizar este tipo de estrategias para el control de la activación de células de la microglía, así como la búsqueda de moléculas anti-inflamatorias que ayuden a contrarrestar la neuroinflamación. En el presente estudio se propone entender los mecanismos moleculares involucrados en la mejora de la EA mediante la inhibición de la inflamación mediada por la activación de la microglía por el uso de un EHA de *M. palviflora*.

## **IV. Hipótesis**

El extracto hidroalcohólico de *Malva parviflora* posee un efecto anti-inflamatorio al disminuir el estado pro-inflamatorio de células de la microglía y promover su capacidad fagocítica

## **V. Objetivos**

### **V.1 Objetivo General**

Evaluar el efecto inmunomodulador del extracto hidroalcohólico de *Malva parviflora* en un modelo murino de la Enfermedad de Alzheimer

### **V.2 Objetivos Particulares**

1. Evaluar el efecto anti-inflamatorio del extracto hidroalcohólico de *Malva parviflora* en cultivos primarios de microglía
2. Evaluar el efecto del extracto hidroalcohólico de *Malva parviflora* sobre la capacidad fagocítica de las células de la microglía
3. Determinar el mecanismo a través del cual el extracto hidroalcohólico de *Malva parviflora* regula la capacidad fagocítica de las células de la microglía.

## VI. Materiales y Métodos

### VI.1 Reactivos

DNasa tipo I, Tripsina tipo III (Sigma), D-MEM/F-12 (gibco), FBS (biowest), Anti-F4/80, Anti-Iba1 (abcam), Anti-GFAP, Anti-Neurofilamento (Cell Signaling),  $\alpha$ -Actina (Santa Cruz Biotechnology), Alexa Fluor 488 anti-mouse/human CD11b (BioLegend), Alexa Fluor 594 Goat Anti-Rata IgG, Alexa Fluor 488 Faloidina (Invitrogen), Fluoroshield (Sigma Aldrich Inc Lipopolisacarido LPS (Sigma), Neural Tissue Dissociation Kit (P), CD11b (Microglía) MicroBeads, Myelin Removal Beads II, LS Columns (Miltenyi Biotec), Raw-Blue Cells, Quanti Blue Assay (InvivoGen)

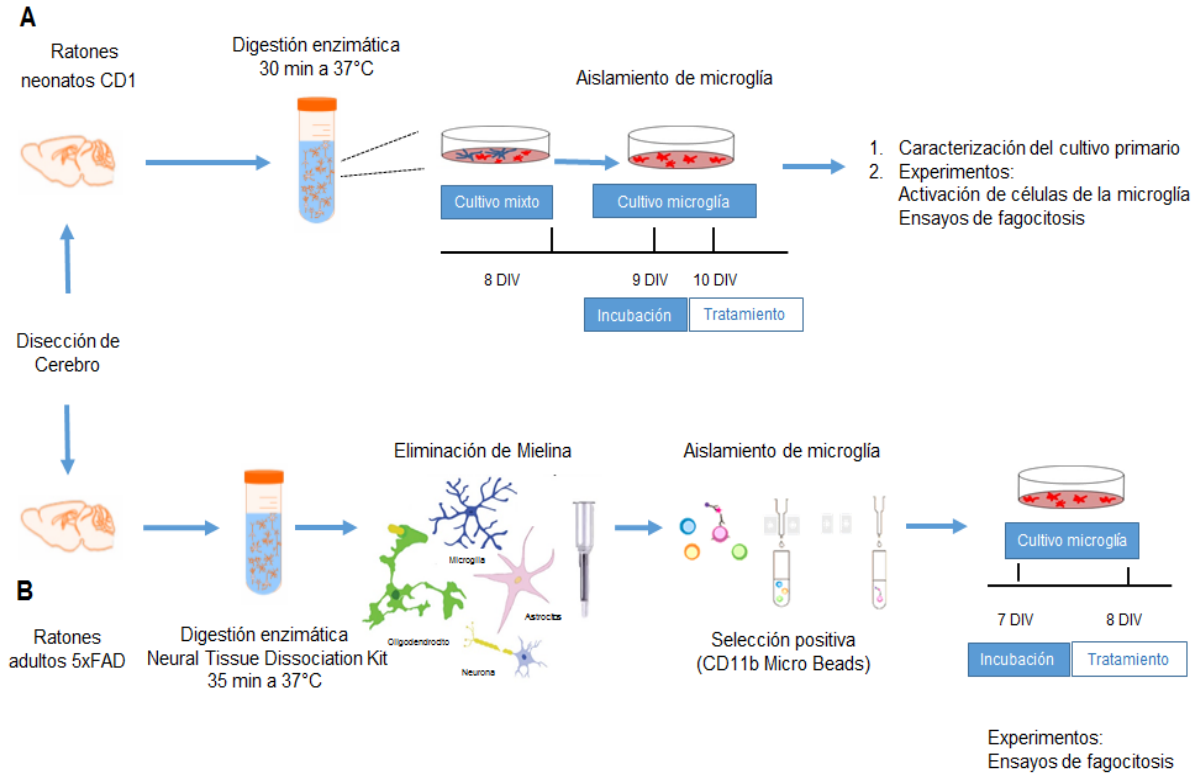
### VI.2 Determinación de la liberación de fosfatasa alcalina en células Raw Blue

Se utilizaron macrófagos murinos (Raw blue) que derivan de células RAW 264.7. Estos macrófagos de manera estable secretan una fosfatasa alcalina embrionaria (SEAP, por sus siglas en inglés), que es un gen inducible para la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1. Las células fueron sembradas en placas de 24 pozos a una densidad de  $1 \times 10^5$  células por pozo. Se utilizó LPS (100ng/ml) como control positivo de activación de NF- $\kappa$ B/AP-1. Las células fueron estimuladas con el EHA de *M. parviflora* (.1, .5, 1 mg/ml), en presencia o ausencia de LPS durante 12 horas (hrs). La actividad de la SEAP en el medio fue determinada por ensayos QUANTI-Blue. Para este ensayo, se utilizaron placas de 96 pozos, a cada pozo se añadieron 50  $\mu$ l de sobrenadante de cada muestra y se aforo con 150  $\mu$ l de QUANTI-Blue. Las placas se incubaron a 37°C por 30 minutos (min). Para determinar los niveles de la SEAP, se usó un lector de placas (iMark microplate) y se realizó la lectura a una absorbancia de 620-655 nm. La actividad de la SEAP se calculó como el cambio de veces para cada muestra [SEAP liberada en el medio de las células tratadas menos el blanco (medio sin células) sobre la SEAP de las células control (tratadas con PBS) menos el blanco].

### **VI.3 Cultivo Primario**

Los cultivos primarios de microglía fueron obtenidos a partir de cerebro total de dos cepas diferentes, CD1 silvestres y 5xFAD que es usado como modelo de la EA. Se realizaron cultivos primarios mixtos (Astrocitos y Microglía) de ratones neonatos CD1 del día postnatal 1-3 (P1-P3), el tejido fue disociado enzimáticamente con tripsina (0,25 mg/ ml) y ADNasa I (0,28 mg/ml) a 37° C durante 30 min. Posteriormente se realizó una dispersión mecánica con pipetas Pasteur de diferente diámetro. Finalmente la dispersión celular fue sembrada a una densidad de 2 cerebros por caja Petri de 100 mm, en medio DMEM/F12 suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (FBS), glutamina 2 mM y 1 % antibióticos. Después de una semana, la microglía fue aislada a partir del cultivo mixto por agitación durante 5 hrs a temperatura ambiente (TA) a 250 rpm. Los cultivos primarios de microglía se mantuvieron durante 24 hrs y posteriormente se realizaron los experimentos correspondientes. Para los cultivos primarios de adultos 5xFAD de 8 y 10 meses de edad, el tejido se digirió enzimáticamente con el Kit (Neural Tissue Dissociation Kit (P)). Posteriormente el debri de mielina fue eliminado con ayuda de unas perlas magnéticas (Myelin Removal Beads II). Finalmente la microglía fue aislada por selección positiva mediante el Kit (CD11b (Microglia) MicroBeads). Para evaluar la pureza de las células aisladas se realizó citometría de flujo, con un anticuerpo específico para microglía (CD11b). Los cultivos primarios de microglía fueron mantenidos en medio DMEM/F12 suplementado durante una semana hasta realizar los experimentos correspondientes. Para más detalles de la metodología consultar el anexo XI.2.





**Figura 3.- Metodología utilizada para cultivo primario de microglía**

**A)** Se muestra la metodología para ratones neonatos CD1 **B)** Se muestra la metodología utilizada para ratones adultos 5xFAD.

### Caracterización del cultivo primario

La pureza del cultivo primario de microglía de neonatos, se determinó mediante la detección de diversos marcadores específicos para las diferentes poblaciones celulares, MG (CD11b y F4/80), Astroglía (GFAP) y Neuronas (Neurofilamento “Nef”), por ensayos de *RT-PCR*, Inmunofluorescencia y citometría de flujo, todos los protocolos se describen con detalle en el anexo XI.3.

### *RT-PCR*

Se realizó la extracción de RNA total a partir de cultivos de microglía por el método de Tiocianato de Guanidina (Chomczynski y Sacchi 1987). Se determinó su concentración en un equipo NanoDrop y se evaluó su integridad en un gel de agarosa al 0.07%. Para la reacción de la retrotranscripción (RT) se utilizó un 1 ug de RNA y la reacción se llevó a

cabo durante 2 horas a 37°C. En la PCR se utilizó 1.5 ul de cDNA en 12.5 ul de mezcla de reacción. Las metodologías de síntesis de cDNA y amplificación por PCR se describen en el anexo XI.3. Las secuencias de oligos utilizadas fueron F4/80: 5'-GTGCCATCATTGCGGGATTC-3' y 5'-GACGGTTGAGCAGACAGTGA -3', Nef: 5'-GAACCACGAGAAGGCTCAAG-3' y 5'- CCTCCTCTTCGTGATTGCTC-3', GFAP: 5'-CAGTTCAGCTGCCAGCGCCT-3' y 5'-GCAGAGGCAGGGCAGGATGG-3', TGFβ1: 5'-TCAGACATTCGGGAAGCAGT-3' y 5'- TCGAAAGCCCTGTATTCCGT-3' y Actina: 5'-GGGTCAGAA GGA CTCTATG-3' y 5'-GGTCTCAAACATGATCTG GG -3'.

#### Inmunofluorescencia anti-F4/80

Las microglías fueron sembradas en un Lab-Tek, un total de  $1 \times 10^5$  células por pozo. Las células fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% por 30 min a TA y fueron permeabilizadas con PBS-T 0.1% (PBS 1x, Tritón 0.1% (Tritón X-100)). El bloqueo se realizó con PBS-albumina al 10% (PBS 1x, BSA 10%). Posteriormente las células fueron incubadas en un buffer de dilución PBS-albumina 5%, tritón 0.1% (PBS 1x, BSA 5%, Tritón 0.1%) con el anticuerpo primario anti-F480 (1:200) toda la noche a 4°C. Finalmente se incubó el anticuerpo secundario Goat anti-rata IgG acoplado a Alexa Flour 594 a TA cubierto de la luz. Las células fueron observadas en un microscopio confocal Olympus FV1000 y para la generación de imágenes se utilizó el software fiji.

#### Citometría de Flujo

Para la los ensayos de citometria se utilizaron  $2.5 \times 10^5$  células. Las microglías se incubaron con anti-CD11b-Alexa Flour 488 a una dilución (1:2000) en 100 ul de FACS Juice por 20 min a 4°C en la oscuridad. Para el control negativo se utilizaron células adheridas a la placa (Cultivo mixto), posteriormente fueron fijadas con PFA al 4%, finalmente se pasaron por el citómetro (FACS Canto II), para el análisis de datos y generación de graficas e histogramas se utilizó el software Flow Jo.

## **VI.4 Determinación de activación de células de la microglía**

Los cultivos primarios de microglía de neonatos se sembraron en Lab-Teck,  $1 \times 10^5$  células por pozo. Se utilizó LPS (100ng/ml) como control de activación de la microglía. Las

células se estimularon con el EHA de *M. parviflora* (1 mg/ml) en presencia o ausencia de LPS durante 24hrs. Posteriormente el sobrenadante fue eliminado y las células se fijaron con PFA al 4% durante 30 min a TA. Las células se permeabilizaron con PBS-T 0.1% durante 30 min. Para visualizar la morfología de las células, se realizó la tinción del citoesqueleto de actina con faloidina conjugada a Alexa Fluor 488 (1:500) durante 1h protegido de la luz. Los núcleos de las células se tiñeron con 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, por sus siglas en inglés) (1:5000) durante 15 min protegido de la luz. Las imágenes de las células de la microglía fueron observadas en un microscopio Confocal Olympus FluoView 1000, se tomaron siete campos al azar por cada tratamiento y para la generación de imágenes se utilizó el software Fiji. Finalmente se cuantifico las diferentes morfologías de las células (ameboide, ramificadas y formas intermedias).

## **VI.5 Ensayos de Fagocitosis**

Se realizaron ensayos de fagocitosis, para evaluar el efecto del EHA de *M. parviflora* sobre la capacidad fagocítica de células de la microglía de ratones neonatos y de adultos (Wt/5xFAD). Para los cultivos primarios de microglía de neonatos ( $1 \times 10^5$  células por pozo) fueron sembradas en placas de 24 pozos. Posteriormente el medio de cultivo fue remplazado por medio fresco y se estimuló con EHA de *M. parviflora* (1mg/ml) durante 24hrs, se utilizaron macrófagos peritoneales y LPS (100ng/ml) como controles positivos. Después de los estímulos, las células fueron incubadas con esferas de látex de 0.8  $\mu\text{m}$  de diámetro en una proporción de 1:5 por célula durante 4h a 37°C. Las esferas no fagocitadas fueron desechadas mediante 3 lavados de PBS, posteriormente las células fueron fijadas con PFA al 1% durante 15 min. Las imágenes se obtuvieron en un microscopio invertido (Nikon TMS), se registraron un mínimo de 3 campos al azar, los cuales fueron cuantificados para determinar el porcentaje de fagocitosis. Para los cultivos primarios de adultos (Wt y 5xFAD) de ocho y diez meses de edad ( $1 \times 10^5$  células por pozo) se sembraron en Lab-Tek. Las células fueron mantenidas durante una semana antes de los experimentos. Posteriormente el medio de cultivo fue remplazado por medio fresco y se realizó el estímulo con el EHA de *M. parviflora* (1 mg / ml) durante 24 horas. En seguida se eliminó el medio de cultivo y se puso medio fresco que contenía bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) fluorescentes en una proporción 1:10 por cada célula,

posteriormente el cultivo fue incubado durante una hora a 37°C. Para eliminar las bacterias no fagocitadas, los cultivos se lavaron exhaustivamente con PBS y se trataron con geneticina (20ug / ml) durante 30 min, posteriormente las células se fijaron en PFA al 4% durante 30 min a TA. La tinción de actina y del núcleo se realizó como se describe anteriormente. Las imágenes de las células se obtuvieron con un microscopio confocal Olympus FluoView 1000, para su análisis se recolectaron siete campos al azar por cada grupo y para la generación de imágenes se utilizó el software Fiji. El índice de fagocitosis se determinó multiplicando el porcentaje de células de microglía con bacterias internalizadas por el número promedio de bacterias *E. coli* internalizados por células (Luo, *et al.*, 2009).

## **VI.6 Animales**

Se utilizaron ratones de la cepa 5xFAD, que coexpresan 5 mutaciones asociadas al desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer Familiar (5xFAD por sus siglas en inglés, Familial Alzheimer's Disease). Estos ratones transgénicos sobreexpresan la APP humana con tres mutaciones (Sueca (K670N, M671L), Florida (I716V), Londres (V717I)) y dos en la presenelina 1 (M146L y L286V). Ambos transgenes están regulados por el control transcripcional del promotor Thy1, que se expresa tejido-específico en el SNC. Los ratones transgénicos se obtuvieron del Laboratorio Jackson (Bar Harbor, Maines, USA). Los animales fueron mantenidos y criados en heterocigocidad en el fondo genético (C57BL/6xSJL), a una temperatura y humedad controlada, con un ciclo de 12 hrs de luz/oscuridad. Como controles se utilizaron ratones silvestres (Sil) es decir, ratones negativos para las mutaciones. Para los experimentos, se utilizaron ratones machos Sil y 5xFAD (4 semanas de edad), que fueron mantenidos en grupos de 5 ratones por jaula y alimentados con una dieta normal (DN) (Harlan, Tekland 2018SX) o una dieta alta en grasa (DAG) (Research Diets, D12492). Estos grupos de ratones fueron administrados por vía gástrica con el EHA de *M. parviflora* a una concentración de 50mg/ml/kg o el vehículo durante 8 meses, la metodología se describe en la Figura 4.



**Figura 4.- Metodología utilizada para el experimento *in vivo***

#### Inmunofluorescencia de tejido (Iba y Tioflavina S)

Los ratones fueron anestesiados y se perfundidos en solución salina. El tejido se fijó con una solución de PFA al 4%. Los cerebros fueron mantenidos en PFA al 4% durante toda la noche y para la preservación del tejido se pusieron en una solución de sacarosa al 30% a 4°C. Posteriormente se generaron cortes histológicos sagitales de un grosor de 30  $\mu$ m y se realizaron co-tinciones (Iba-1 y Tioflavina S). Para observar las células de la microglía se utilizó un marcador específico Iba1, primero se realizó la recuperación antigénica con citrato de sodio, posteriormente el tejido se lavó tres veces con PBS-T 0.25% (PBS 1x, Tritón 0.25%) y se incubaron con solución de bloqueo PBS-T 0.25% BSA 1% (PBS 1x, 0.25% Tritón y 1% BSA) durante 1h a TA. Los cortes fueron incubados con el anticuerpo primario anti-Iba1 (1:200) en solución de bloque durante toda la noche a 4°C, posteriormente fueron lavados. Los cortes fueron incubados con el anticuerpo secundario anti-goat acoplado a Alexa Fluor 59 (1:400) durante 1h cubierto de la luz. Posteriormente se realizó la tinción con Tioflavina S para determinar la presencia de la deposición del péptido  $\beta$ A en forma de placas. Las rebanadas fueron incubadas con tioflavina S al 1% durante 5 min, después se realizaron lavados consecutivos con alcohol al 80%, 70% y agua destilada. Finalmente los cortes fueron montados con fluoroshield, los detalles de la metodología de las tinciones se describen en el anexo 3. Las imágenes

se obtuvieron en un microscopio confocal de disco giratorio 3I Marianas y se procesaron usando el software SlideBook 6 Reader.

## **VI.7 Análisis estadístico**

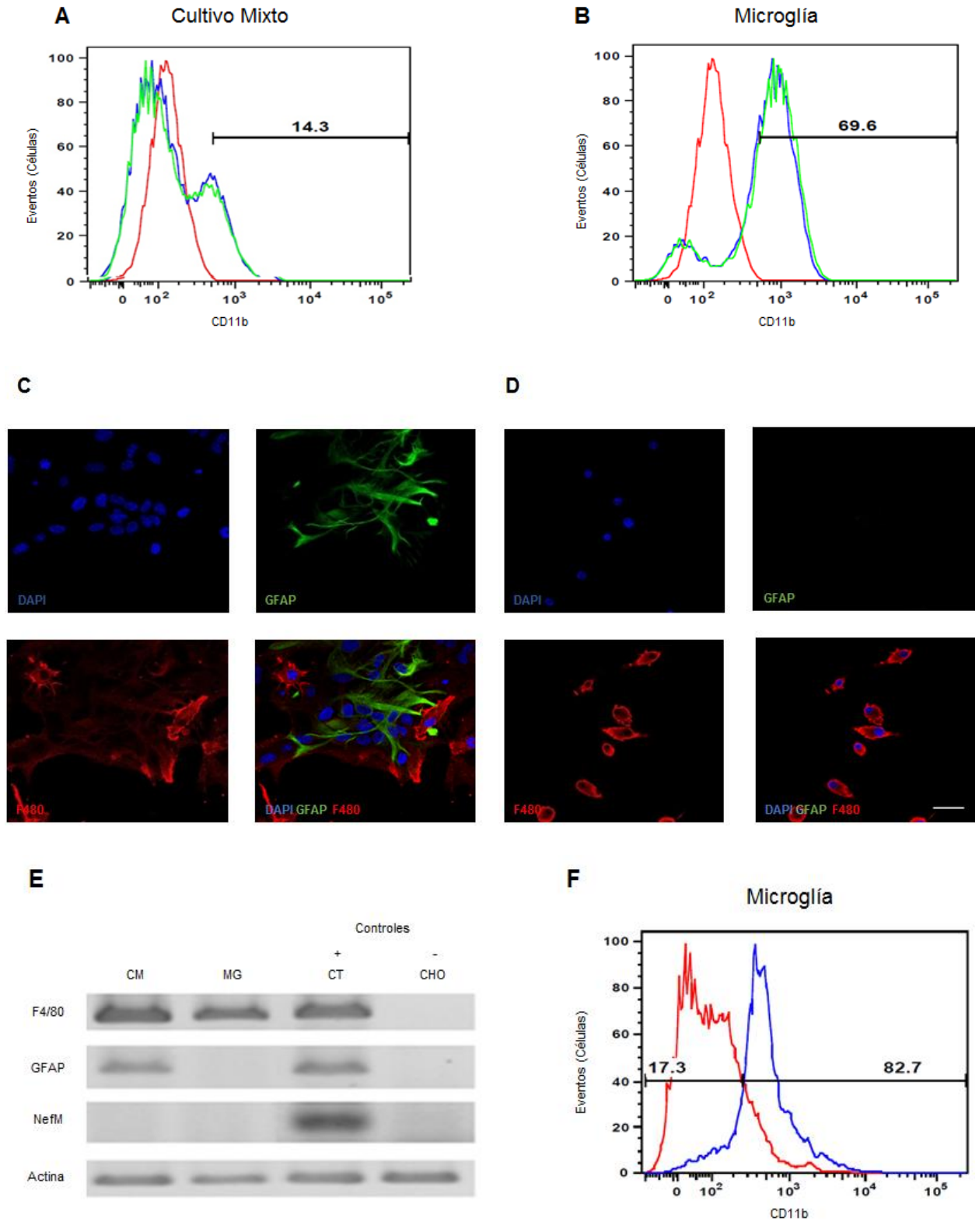
Los valores obtenidos de los diferentes experimentos fueron reportados como medias  $\pm$  error estándar. Para conocer las diferencias entre grupos, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey, se utilizó el programa GraphPad Prism 6 para hacer el análisis. Se consideraron estadísticamente significativas aquellas pruebas con un valor de  $p < 0.05$ .

## **VII. Resultados**

### **VII.1 Aislamiento del cultivo primario de microglía y caracterización**

La investigación sobre las funciones de células de la microglía en procesos neuroprotectores o neurotóxicos, requiere de un método eficaz para su aislamiento y cultivo. En el presente trabajo se desarrolló un método para aislar y mantener en cultivo células de la microglía. Se logró obtener un cultivo puro de células de la microglía. Como se muestra en la figura 5, el cultivo primario mostró un enriquecimiento del 69% en células de la microglía (Fig. 5B) en comparación con el cultivo mixto que solo posee el 14.3% de células positivas para CD11b y F4/80 (Fig. 5A).

Para obtener una mejor pureza después de su aislamiento, el cultivo aislado fue lavado para eliminar el resto celular y otro tipo de células. Como se muestra en las micrográficas, en el cultivo mixto se observa la presencia de astrocitos positivos para GFAP (verde) y microglía positivos para F4/80 (rojo) en azul se muestran los núcleos celulares teñidos con DAPI (Fig. 5C), mientras que en el cultivo de microglía, no se observa la presencia de astrocitos (Fig. 5D), por lo que se logró obtener una pureza del 100% de células de la microglía. Esta observación fue corroborada por ensayos de RT-PCR los cuales mostraron que los cultivos primarios de microglía expresan únicamente F4/80 y no así GFAP o neurofilamento (Fig. 5E). Dado que en este estudio se requiere caracterizar células de la microglía de animales 5XFAD adultos, se estandarizó el aislamiento de estas células mediante selección positiva usando CD11b como marcador de selección y citometría de flujo. Como se muestra en la figura 5F, el análisis por citometría de flujo mostró una pureza mayor al 80%.



**Figura 5.- Caracterización del cultivo primario de microglía de ratones neonatos CD1 y adultos 5xFAD**



Las células fueron aisladas y se determinó su pureza por medio de diferentes marcadores (Microglía: F4/80 y CD11b, Astroglía: GFAP, Neuronas: Neurofilamento). **A)** Histograma de células de cultivo mixto. **B)** Histograma de células de la microglía aisladas. **C)** Se muestran micrografías representativas de cultivo mixto. Se observa la presencia de astrocitos y microglía. **D)** Se muestran micrografías representativas de un cultivo primario de microglía, donde se observan sólo la presencia de microglía (Scale bar: 30µm). **E)** Análisis por PCR de los marcadores específicos para microglía (F4/80), astrocitos (GFAP), neuronas (NF). **F)** Histograma de células de la microglía aislada de cerebro de ratones adultos.

## VII.2 Activación de la microglía ante un estímulo pro-inflamatorio

Con la finalidad de realizar estudios experimentales con las células de microglía aisladas inicialmente, se diseñaron ensayos de funcionalidad usando LPS y se utilizaron macrófagos peritoneales como control positivo. Se observa que las células de la microglía responden al estímulo de LPS ya que adquieren una morfología ameboide que es característico de su activación en comparación al control que muestra una morfología ramificada. También se puede observar que en ambas células macrófagos y microglía cuando son estimuladas con LPS la expresión de F4/80 es mayor (Fig. 6).

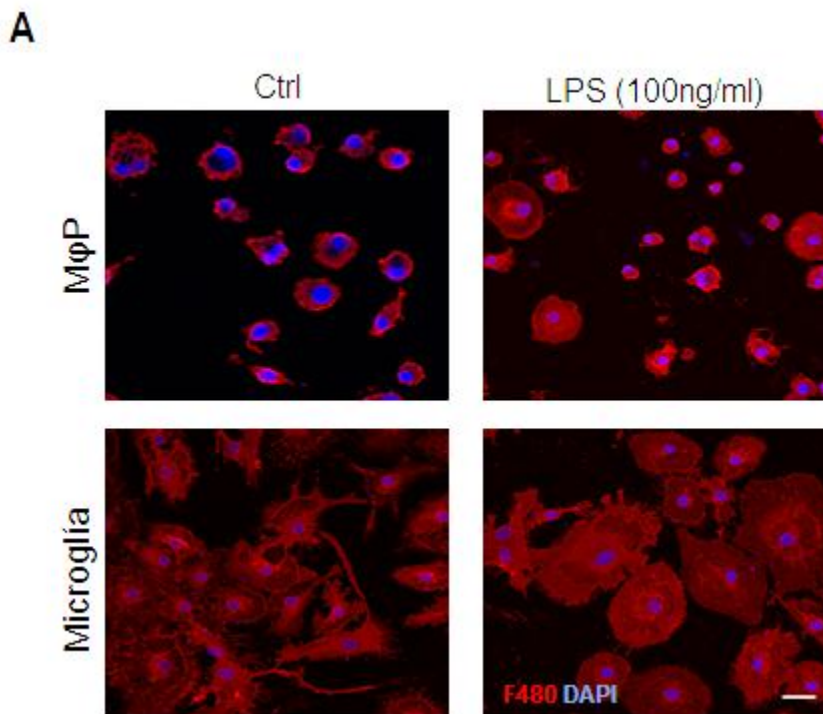
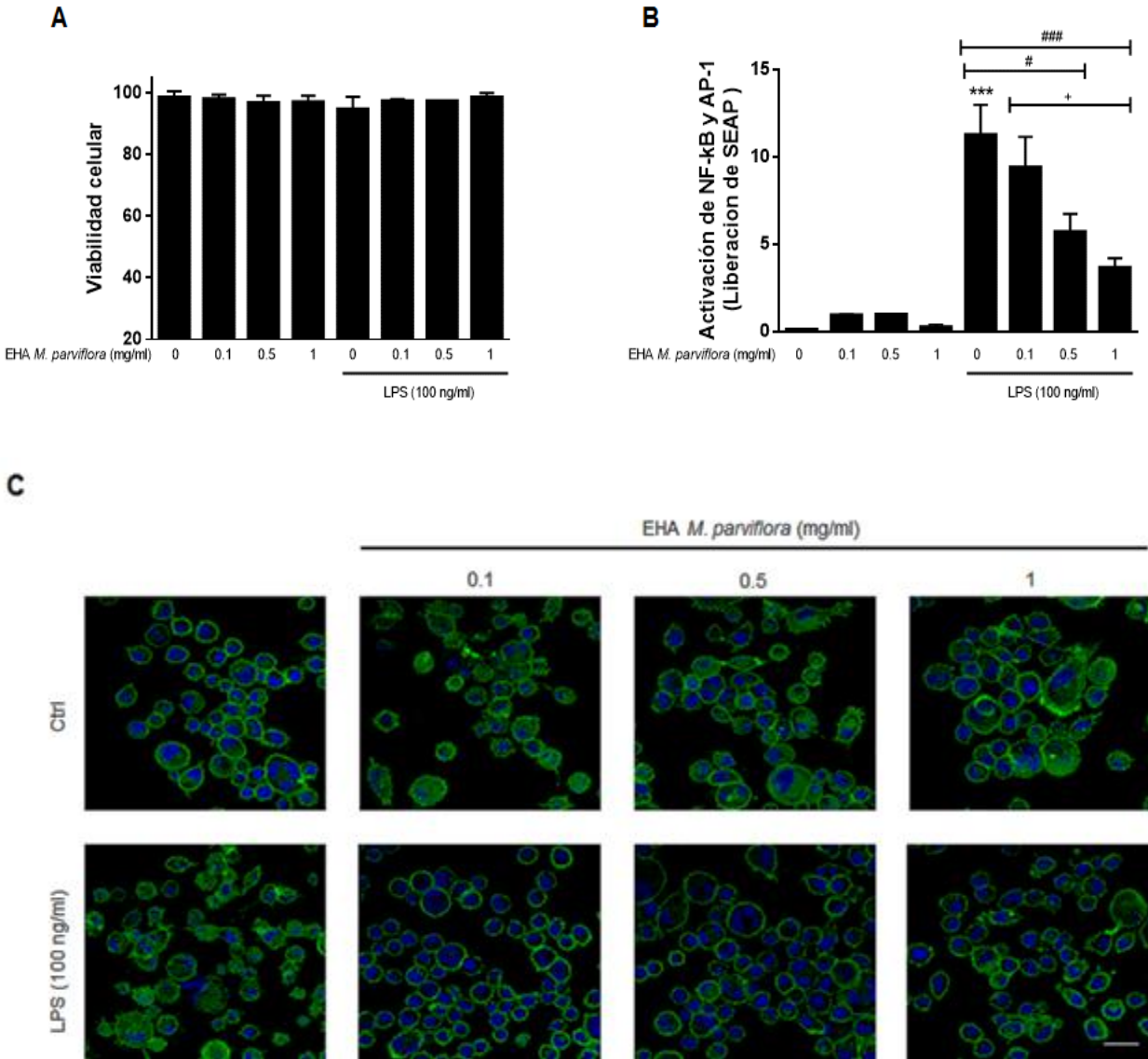


Figura 6.- Activación del cultivo primario de microglía

Las células (MG y MOP), fueron tratadas durante 24hrs con LPS (100ng/ml). **A)** Micrografías representativas de la morfología de las células después de ser estimuladas con LPS. En rojo se observa F4/80 y en azul tinción nuclear con DAPI (Scale bar 30  $\mu$ m). Se observa la morfología ameboide de células de la microglía que fueron tratadas con LPS.

### **VII.3 El Extracto Hidroalcohólico de *Malva parviflora* atenúa la activación de NF- $\kappa$ B/AP1 en macrófagos Raw Blue**

Un grupo de investigación reportó que extractos de *Malva parviflora* poseen propiedades anti-inflamatorias (Shale *et al.*, 2005). Una de las vías principales en el proceso inflamatorio es la vía de NF- $\kappa$ B la cual ha sido reportada que juega un papel importante en la patogénesis de la EA (Chen *et al.*, 2005a). Con base en estos antecedentes, se evaluó el efecto anti-inflamatorio del EHA de *M. parviflora* en un modelo *in vitro*. Utilizamos células Raw Blue que tienen un gen inducible (SEAP) para NF- $\kappa$ B/AP1, las células fueron estimuladas con el EHA de *M. parviflora* (0.1, 0.5 y 1 mg/ml) en ausencia o presencia de un estímulo inflamatorio como LPS (100 ng/ml) durante 12 hrs. Primero se evaluó si el EHA de *M. parviflora* tenía efectos tóxicos, por lo que se realizaron ensayos de viabilidad con azul de tripano. El tratamiento con el extracto no afectó la viabilidad celular, ya que se obtuvo una viabilidad mayor al 94% (Fig. 7A). Posteriormente, se determinó la liberación de SEAP mediante ensayos Quati Blue. Se observó un aumento significativo en la activación de NF- $\kappa$ B/AP1 (Liberación de SEAP) en las células tratadas con LPS respecto al control. Mientras que las células co-tratadas con EHA de *M. parviflora* disminuyeron significativamente la activación de NF- $\kappa$ B/AP1 y esta disminución es dosis dependiente, siendo la más significativa la mayor concentración del EHA de *M. parviflora* utilizada (1mg/ml) (Fig. 7B). Los diferentes estímulos no provocan cambios morfológicos en las células (Fig. 7C). Estos datos corroboran el efecto anti-inflamatorio del EHA de *M. parviflora* al regular negativamente vías involucradas en el proceso inflamatorio.

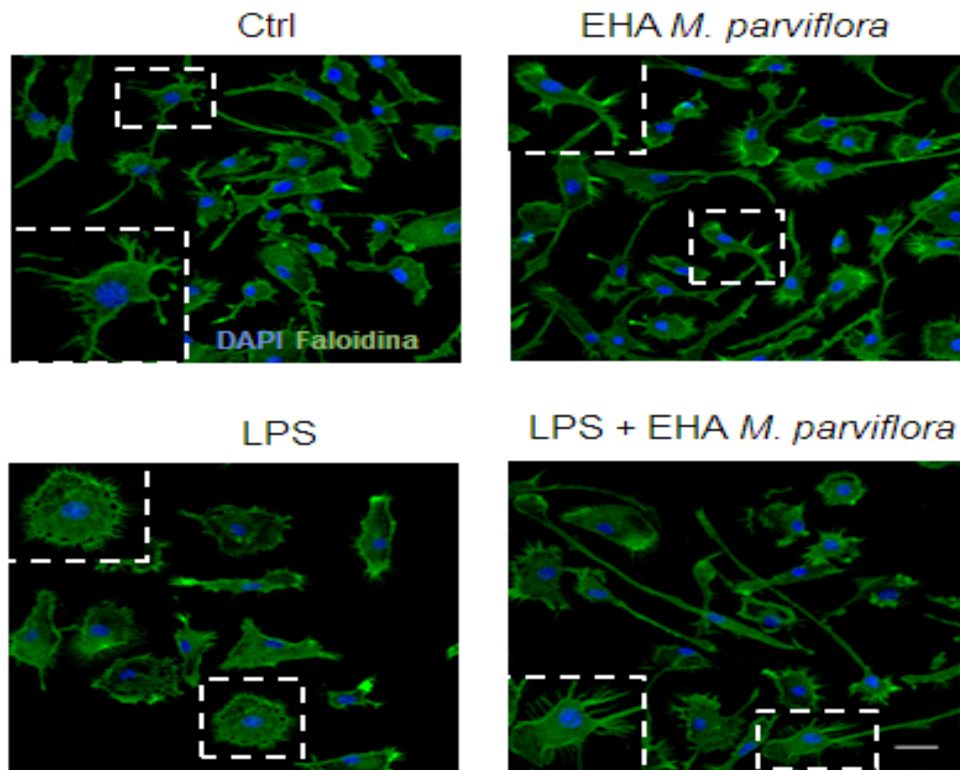
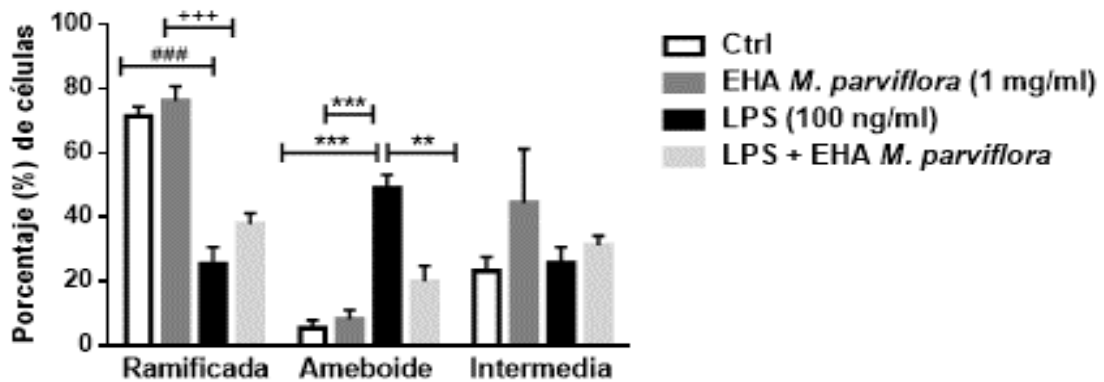


**Figura 7.- Efecto del EHA de *M. parviflora* sobre la activación de NF-κB/AP-1 en macrófagos estimulados Raw blue con LPS.**

Macrófagos RAW 264.7 fueron tratados por 12 hrs con el EHA de *M. parviflora* (0.1, 0.5 y 1 mg/ml), en presencia o ausencia de LPS (100 ng/ml). **A)** Se muestra la viabilidad celular de macrófagos RAW 264.7, se observa que para todos los tratamientos la viabilidad fue mayor al 94%. **B)** Análisis de la liberación de SEAP. Se observa que EHA *M. parviflora* disminuye la liberación de SEAP producida por LPS de manera dosis dependiente. Las barras de error representan la media ± error estándar de ensayos realizados por triplicado. Los signos indican diferencia estadísticamente significativa comparados respecto al control (\*\*p < 0.001), LPS (#p < 0.05, #p < 0.001) LPS + EHA *M. parviflora* (+p < 0.05). Las diferencias fueron comparadas usando ANOVA de una vía en combinación con la prueba de comparación múltiple de Tukey. **C)** Imágenes representativas de la morfología de macrófagos, en verde se observa tinción de actina y en azul tinción nuclear con DAPI (Scale bar: 30 μm).

#### **VII.4 El Extracto Hidroalcohólico de *Malva parviflora* disminuye la morfología ameboide de células de la microglía**

En los últimos años se ha reportado que la activación de las células de la microglía juega un papel central en la EA, ya que constituyen el mediador principal del proceso neuroinflamatorio. Se ha propuesto que inhibir su activación podría ayudar a atenuar el desarrollo de la EA (Biscaro *et al.*, 2012). Basados en estos datos y con el antecedente del efecto anti-inflamatorio del EHA de *M. parviflora* en células Raw Blue, se determinó si el EHA de *M. parviflora*, podría inhibir la activación de células de la microglía. Para ello, se realizaron cultivos primarios de microglía que fueron expuestos a LPS en presencia o ausencia del EHA de *M. parviflora* (1 mg/ml). Se observa que la mayoría de las células control y tratadas con el EHA de *M. parviflora* tenían una morfología ramificada en comparación con las estimuladas solo con LPS (Fig. 8A). Sin embargo, la microglía estimulada con LPS mostró una alteración significativa en la morfología cambiando a una ameboide en comparación con las células control y con las tratadas con EHA de *M. parviflora* que muestran una morfología alargada y multipolar (Fig. 8A, B). Sin embargo, cuando las células son tratadas de manera conjunta LPS+ EHA de *M. parviflora* el fenotipo ameboide es disminuido de manera significativa (Fig. 8A, B). Estos resultados nos sugieren que el EHA de *M. parviflora* tiene un efecto positivo al disminuir la activación de células de la microglía.

**A****B**

**Figura 8. Efecto del EHA de *M. parviflora* sobre la activación de cultivos primarios de microglía estimuladas con LPS**

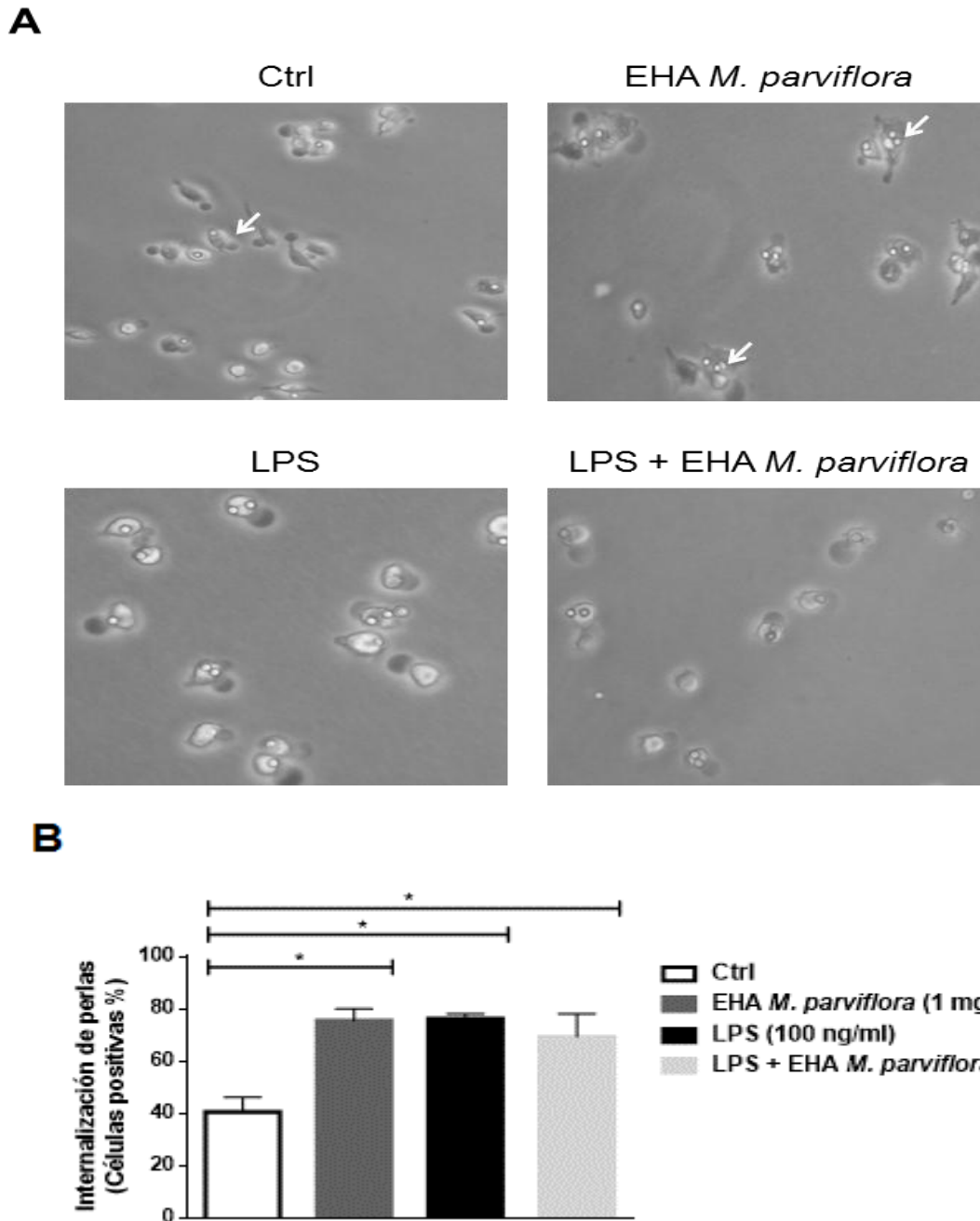
**A)** Micrografías representativas de cultivo primario de microglía de ratones neonatos tratados por 24 hrs con PBS (Ctrl), LPS, EHA *M. parviflora*, y LPS + EHA *M. parviflora*. En verde se muestra el citoesqueleto de actina teñido con anti-faloidina y en azul tinción nuclear con DAPI (Scale bar: 30µm). Se hace un acercamiento, para visualizar las diferentes morfologías de la microglía: ramificadas (localizadas mayoritariamente en las células Ctrl y en aquellas tratadas con el EHA *M. parviflora*), ameboide (LPS) y morfología intermedia en LPS + EHA *Mp*. **B)** Análisis de la

morfología de la microglía (ramificada, ameboide e intermedia). Las barras de error representan la media  $\pm$  el error estándar de por lo menos 7 mediciones para cada condición. Los signos indican diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (### p < 0.001), EHA *M. parviflora* (+++p < 0.001), LPS (\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001). Las diferencias fueron comparadas usando ANOVA de una vía en combinación con la prueba de comparación múltiple de Tukey.

## **VII.5 El Extracto Hidroalcohólico de *Malva parviflora* aumenta la capacidad fagocítica de macrófagos peritoneales y microglía**

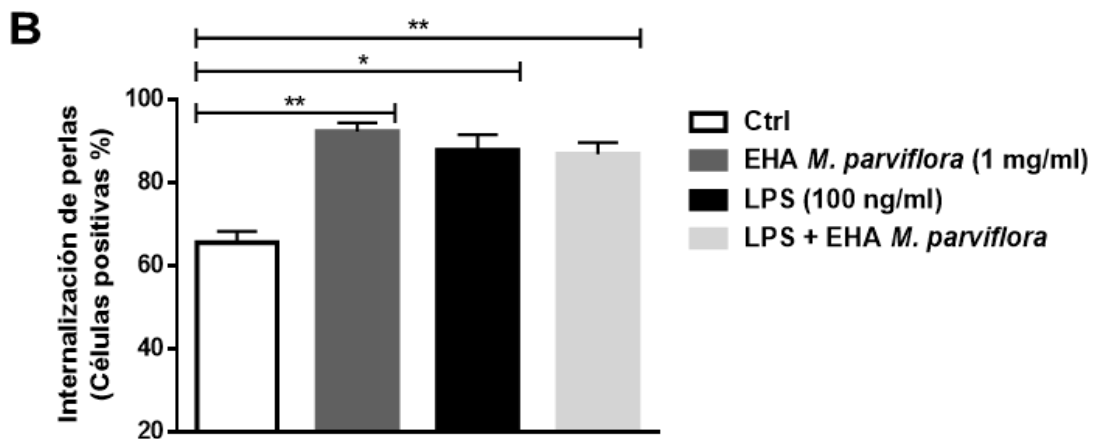
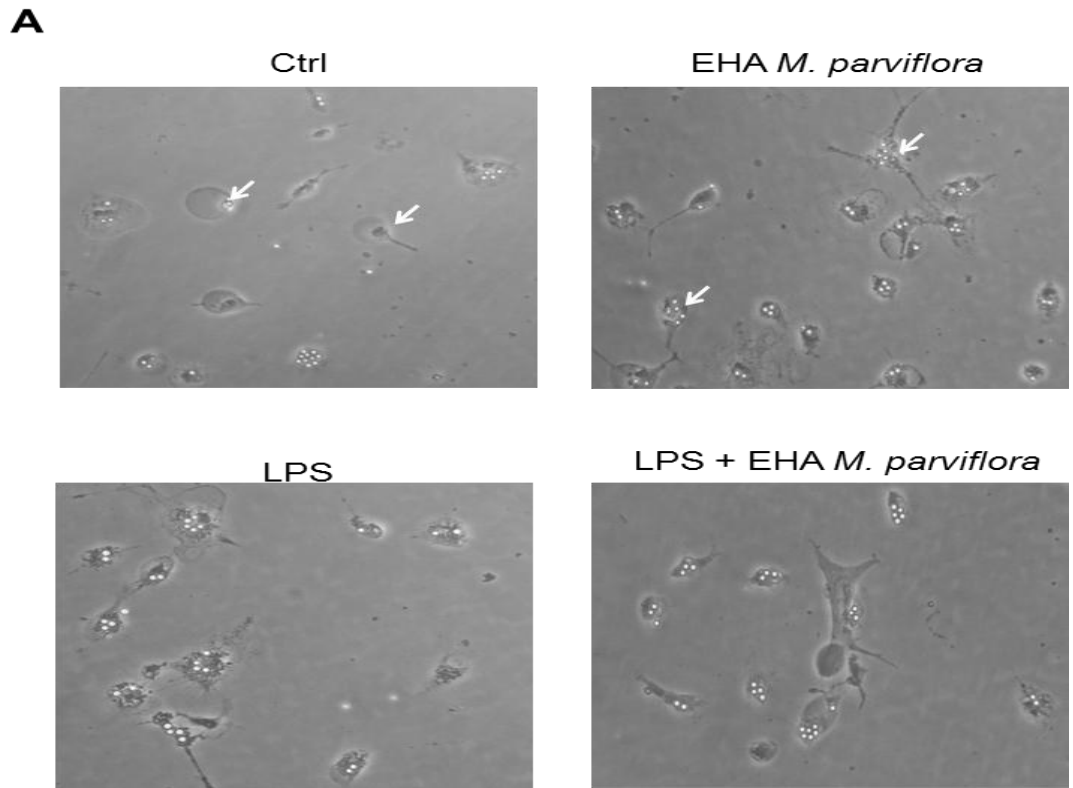
Estudios previos han reportado que la activación constante de células de la microglía por el péptido  $\beta$ A, puede provocar una disminución en su capacidad fagocítica (Hickman *et al.*, 2008). Anteriormente, se demostró que el EHA de *M. parviflora* disminuye significativamente la deposición de placas  $\beta$ A en ratones modelos de la enfermedad de Alzheimer (5xFAD) (Tesis de Maestría Itzia Jiménez-Ferrer, 2012). Basados en estos antecedentes, se evaluó si el EHA de *M. parviflora* regula la capacidad fagocítica de la microglía. Para llevar a cabo este objetivo, primero se realizaron cultivos primarios de macrófagos peritoneales que fueron estimulados con el EHA de *M. parviflora* (1mg/ml) y se utilizó LPS como un inductor de la fagocitosis (Abd-El-Basset y S. Fedoroff, 2004). Como se puede observar en la figura 9A, los macrófagos estimulados con el EHA de *M. parviflora* y LPS incrementaron su capacidad fagocítica, ya que más del 75 % de las células internalizaron al menos una perla de látex. De la misma manera se observó que los macrófagos co-tratados con LPS+ EHA *M. parviflora* aumentaron significativamente su capacidad fagocítica en comparación del control solo el 40 % de células fagocitaron (Fig 9B).

También, se determinó que el EHA de *M. parviflora* aumenta significativamente la capacidad fagocítica de la microglía hasta un 90% con respecto al control 68% (Fig. 10 B), también se observó un mayor número de perlas internalizadas en las células de la microglía (Fig. 10A).



**Figura 9.- Efecto del EHA de *M. parviflora* sobre la capacidad fagocítica de cultivos primarios de macrófagos peritoneales.**

Las células fueron pretratadas por 24 hrs con EHA *M. parviflora*, LPS y LPS + EHA *M. parviflora*. **A)** Imágenes representativas de macrófagos peritoneales que muestran en su interior perlas de látex (flechas) **B)** Análisis de la internalización de las perlas de látex en macrófagos peritoneales. Las barras de error representan la media  $\pm$  el error estándar de por lo menos 3 mediciones para cada condición. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa con respecto a Ctrl ( $*p < 0.05$ ). Las diferencias fueron comparadas usando ANOVA de una vía en combinación con la prueba de comparación múltiple de Tukey.

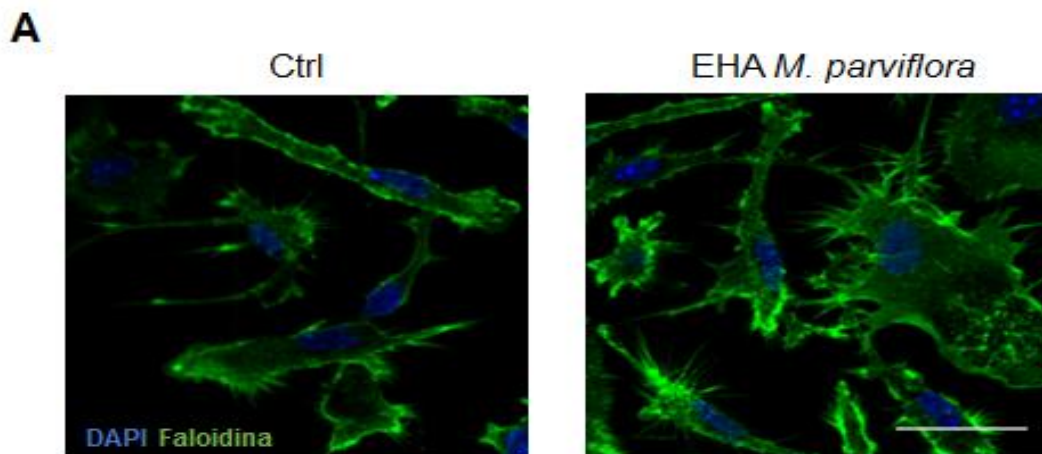


**Figura 8.- Efecto del EHA de *M. parviflora* sobre la capacidad fagocítica de cultivos primarios de microglía.**

Los cultivos fueron pretratadas por 24 hrs con EHA *M. parviflora*, LPS y LPS + EHA *M. parviflora*. **A)** Imágenes representativas de células de la microglía que muestran en su interior celular perlas de látex (flechas) **B)** Análisis de la internalización de las perlas de látex en células de la microglía. Las barras de error representan la media  $\pm$  el error estándar de por lo menos 6 mediciones para cada condición. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa con respecto a Ctrl (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). Las diferencias fueron comparadas usando ANOVA de una vía en combinación con la prueba de comparación múltiple de Tukey.



La fagocitosis implica una serie de eventos coordinados incluyendo la reorganización de actina, la extensión de pseudópodos, la expansión de la membrana plasmática y finalmente la absorción de partículas o microorganismos (Groves *et al.*, 2008). También se observó que las células de la microglía que fueron pretratadas con EHA de *M. parviflora*, tenían más procesos y más filamentos de actina en forma lamelipodia respecto al control (Fig. 11A). Estos datos podrían sugerir que el EHA de *M. parviflora*, incrementa la capacidad fagocítica de células de la microglía a través de la organización del citoesqueleto de actina de las células de la microglía.



**Figura 11.- El EHA de *M. parviflora* promueve la formación de filamentos de actina en la microglía**

**A)** Micrografías representativas de células de la microglía que fueron tratadas por 24 hrs (PBS (Ctrl) y EHA *M.parviflora*), en verde se muestra el citoesqueleto de actina y en azul tinción nuclear con DAPI (Scale bar: 30µm). Las células de la microglía tratadas con el EHA *M. parviflora* se observan más filamentos de actina.

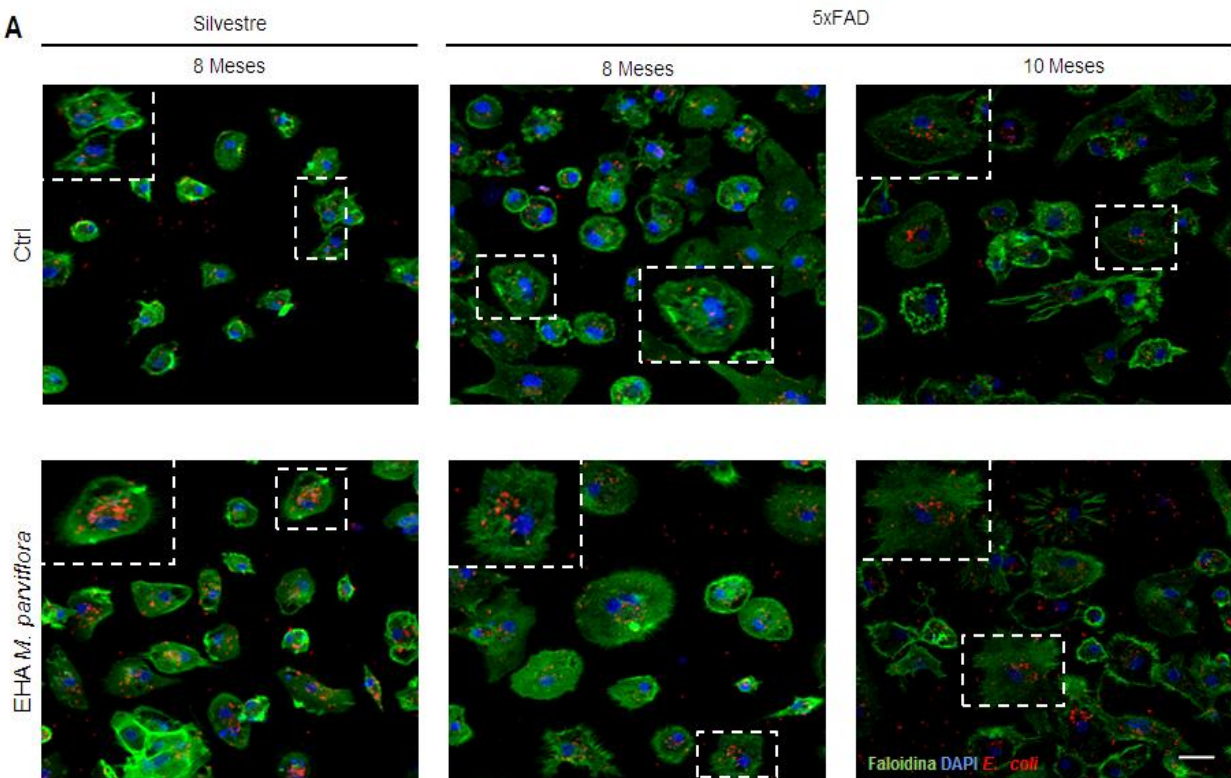
## **VII.6 El Extracto Hidroalcohólico de *Malva parviflora* aumenta la capacidad fagocítica de las células de la microglía de Ratones modelo de la enfermedad de Alzheimer 5xFAD**

Se ha reportado que las células de la microglía son incapaces de fagocitar el péptido  $\beta$ A, en etapas avanzadas de la enfermedad de la EA. Los antecedentes del grupo, demostraban que tratamiento con EHA de *M. parviflora* decrece los niveles de las  $\beta$ A en ratones 5xFAD que fueron tratados durante 8 meses. Adicionalmente en este trabajo se determinó que el extracto aumenta la capacidad de células de la microglía de ratones neonatos y macrófagos peritoneales. Por lo que, se decidió evaluar si EHA de *M. parviflora* también podría mejorar o restaurar la capacidad fagocítica de la microglía de ratones adultos. Para ello, se aislaron células de la microglía de ratones silvestres y 5xFAD de 8 y 10 meses de edad, que fueron tratadas en presencia o ausencia del EHA de *M. parviflora* (1mg/ml) durante 24 hrs. Se realizaron ensayos de fagocitosis usando *E. coli* fluorescentes.

Como se puede observar en la figura 12A las células de la microglía que fueron tratadas con EHA de *M. parviflora* tienen más bacterias en su interior, con respecto a las células control. Este aumento de fagocitosis se observó en los ratones silvestres y en los 5xFAD. Los ratones 5xFAD de 8 y 10 meses de edad mostraron un aumento significativo en la capacidad fagocítica de células de la microglía, cuando son tratadas con el EHA de *M. parviflora* (Fig. 12B). Igualmente, se observó que en su estado basal las células de la microglía que fueron aisladas de los ratones 5xFAD, tienen una tendencia menor en su capacidad fagocítica con respecto al silvestre (Fig. 12B).

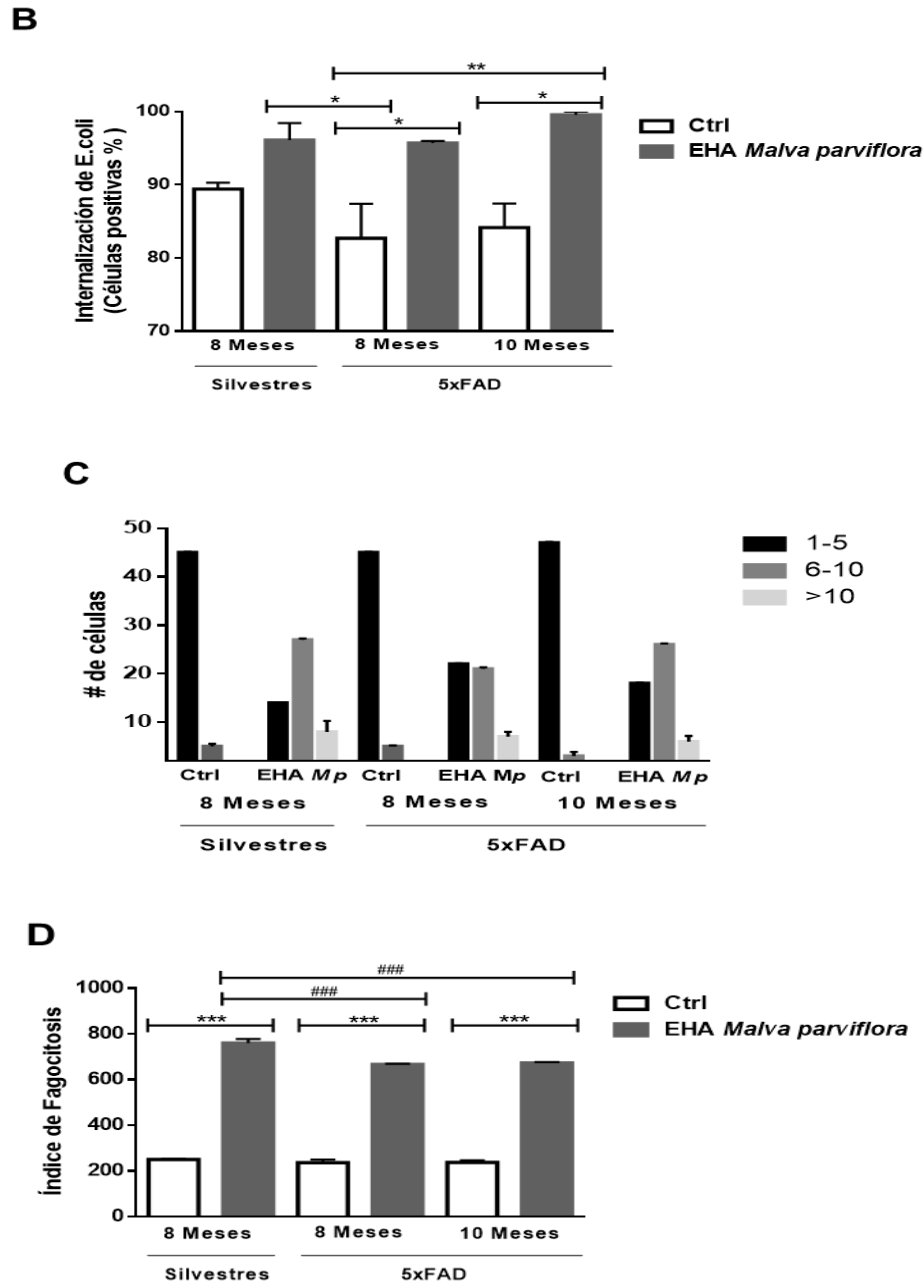
Para corroborar que las células tratadas con el EHA de *M. parviflora* tenían más bacterias en su interior, se determinó el promedio de número de bacterias que fagocito cada microglía, como se observa las células de la microglía que fueron tratadas con EHA de *M. parviflora* tienen una mayor capacidad para internalizar bacterias (5, >10) en comparación con el control que su capacidad es menor, ya que la mayoría de las células de la microglía fagocitan de 1-5 bacterias (Fig. 12C). Para poder visualizar mejor las

diferencias en la capacidad fagocítica, se calculó el índice de fagocitosis. Las células de la microglía de los ratones silvestres y 5xFAD tratadas con el EHA de *M. parviflora* tienen un mayor índice de fagocitosis respecto a las células control, estas diferencias son significativas y corrobora que el extracto estimula la fagocitosis de células de la microglía (Fig. 12D). Estos datos, sugieren que el EHA de *M. parviflora* regula la capacidad fagocítica de células de la microglía de ratones 5xFAD, y correlacionan con los experimentos *in vivo*, donde se demuestra que el EHA de *M. parviflora* disminuye la deposición de placas  $\beta$ A en la zona de hipocampo y corteza de los ratones 5xFAD. Estos datos en conjunto, nos sugieren que el extracto está promoviendo la fagocitosis del péptido  $\beta$ A en células de la microglía.



**Fig 12.- Efecto del EHA de *M. parviflora* sobre la capacidad fagocítica de cultivos primarios de microglía de ratones silvestres y 5xFAD de ocho y diez meses de edad.**

Las células de la microglía fueron pretratadas durante 24 hrs (PBS (Ctrl) y EHA *M. parviflora*). **A)** Micrografías representativas de la localización intracelular de *E.coli* fluorescente (en rojo) presentes en el interior de la microglía. En verde se muestra el citoesqueleto de actina teñido anti-faloidina y en azul tinción nuclear con DAPI (Scale bar: 30  $\mu$ m).



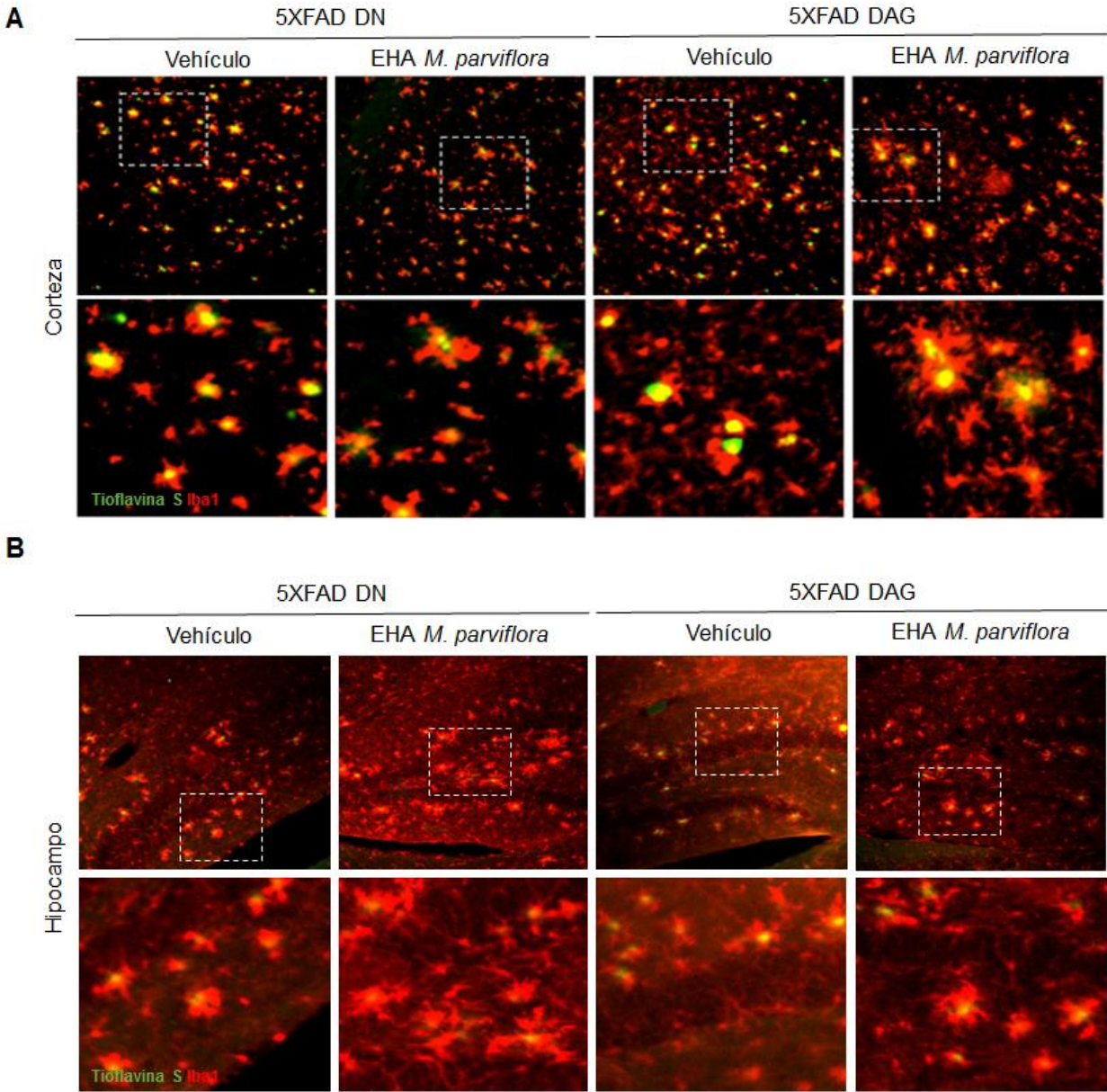
**Fig 12.- Efecto del EHA de *M. parviflora* sobre la capacidad fagocítica de cultivos primarios de microglía de ratones silvestres y 5xFAD de ocho y diez meses de edad.**

Las células de la microglía fueron pretratadas durante 24 hrs (PBS (Ctrl) y EHA *M. parviflora*). **B)** Análisis de la internalización de bacterias en células de la microglía. **C)** Análisis del número de bacterias promedio internalizadas por célula. **D)** Cálculo del índice de fagocitosis de la microglía. Las barras de error representan la media  $\pm$  el error estándar de por lo menos 100 células. Los signos indican diferencia estadísticamente significativa comparada respecto a cada control (\* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ), EHA *M. parviflora* (### $p < 0.001$ ). Las diferencias fueron comparadas usando ANOVA de una vía en combinación con la prueba de comparación múltiple de Tukey.

## VII.7 El Extracto Hidroalcohólico de *Malva parviflora* disminuye al fenotipo M1 en células de la microglía de ratones 5xFAD

Una de las estrategias para atenuar la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer es el desarrollo de fármacos, que están dirigidos a modular los estados de activación de células de la microglía. Una de estas estrategias es la polarización a M2 de las células de la microglía como una opción terapéutica, ya que las células de la microglía adquieren un fenotipo neuroprotector y le confiere una mayor capacidad fagocítica (Cherry *et al.*, 2014). Por otra parte existen informes que muestran que las células que se encuentran alrededor de la placa, sufren cambios morfológicos (Glass *et al.*, 2010) y moleculares ya que las células de la microglía tienen un fenotipo M1 (Akiyama, 1994; Glass *et al.*, 2010; Rogers, 2008). Por lo anterior, se decidió evaluar si el EHA de *M. parviflora*, podría regular estas alteraciones en ratones 5xFAD. Se realizaron inmunofluorescencia en corteza e hipocampo y se utilizó un marcador específico (Iba1) para observar las células de la microglía. Se corroboró que el EHA de *M. parviflora* disminuye la deposición de placas  $\beta$ A en ratones 5xFAD y se modifica la morfología de células de la microglía (Fig. 13 A, B).

Se observó que en los ratones 5xFAD que fueron administrados con el EHA de *M. parviflora*, la morfología de la microglía era más ramificada es decir, tenía más procesos largos y finos en comparación con los ratones no tratados donde se observó una morfología ameboides que se asocia a un estado activado, esto se observó principalmente en el hipocampo de los ratones (Fig. 13B). Adicionalmente se observó una mayor deposición de células de la microglía alrededor de las placas de ratones tratados con respecto a los no tratados, lo que nos podría sugerir que el EHA de *M. parviflora*, promueve la microgliosis alrededor de las placas y tal vez este promoviendo la eliminación del péptido  $\beta$ A.

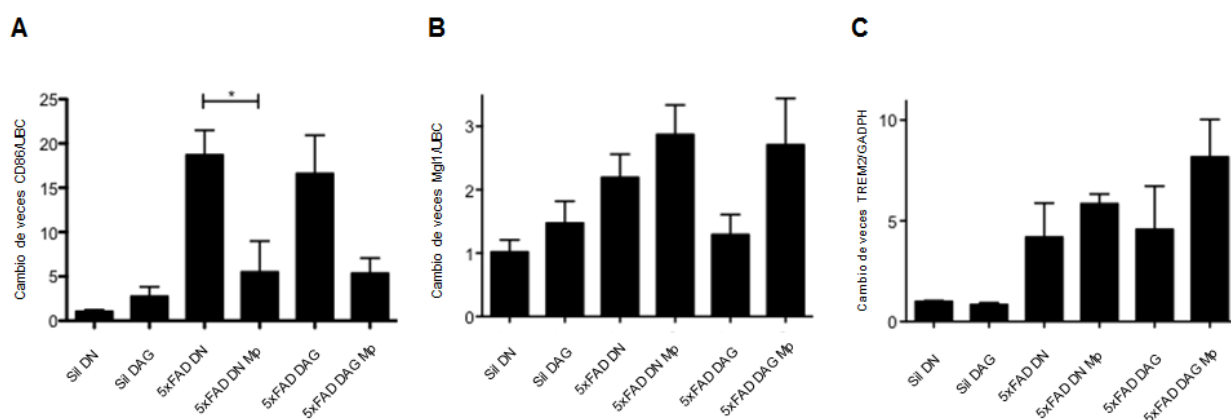


**Figura 13.-Efecto del EHA de *M. parviflora* sobre las células de la microglía en ratones 5xFAD.**

Se realizaron cotinciones en cortes histológicos de corteza e hipocampo de ratones 5xFAD que fueron alimentados con una DN o DAG. **A y B)** Micrografías representativas de células de la microglía localizadas alrededor de las placas  $\beta$ A. En rojo se muestra las células de la microglía teñidas con anti-Iba1 y en verde las placas  $\beta$ A teñidas con Tioflavina S. El EHA *M. parviflora*, Las células de la microglía de ratones que fueron administrados con el EHA *M. parviflora* tienen una morfología ramificada en comparación con los no tratados que tienen una morfología activada y el extracto estimula la localización de células de la microglía alrededor de las placas.

Con la finalidad de corroborar que el EHA de *M. parviflora* disminuye la activación de células de la microglía, se evaluaron los cambios en la expresión de RNAm de marcadores de activación de células de la microglía (M1:CD86, M2:Mgl1y TREM2) en la corteza.

El nivel de expresión de CD86 fue reducido significativamente en las muestras de ratones alimentados con una DN y tratados con el EHA de *M. parviflora* en comparación con los no tratados (Fig. 14A). Mientras que el Mgl1 se incrementó muy poco en ratones tratados con el extracto respecto a los no tratados (Fig. 14B). Adicionalmente se evaluó la expresión de un marcador de fagocitosis TREM2, se observó un pequeño incremento en los ratones que fueron administrados con EHA de *M. parviflora* en comparación con los ratones no tratados (Fig. 14C). Estos datos, demuestran que el EHA de *M. parviflora* ejerce su efecto anti-inflamatorio, a través de inhibir el fenotipo pro-inflamatorio en ratones 5xFAD.



**Figura 14. El EHA de *M. parviflora* disminuye el fenotipo pro-inflamatorio de células de la microglía en corteza de ratones 5xFAD.**

Se realizó la extracción de RNAm de corteza de ratones wt y 5xFAD que fueron alimentados con una DN o DAG, y adicionalmente fueron administrados con el EHA de *M. parviflora* o con el vehículo **A)** Análisis de expresión de CD86 por qPCR **B)** Análisis de la expresión de Mgl1 por qPCR. **C)** Análisis de la expresión de TREM2 por qPCR. Se observó una disminución en la expresión de CD86 en los ratones que fueron tratados con el EHA *M. parviflora* en comparación con los ratones no tratados. Mientras que en los marcadores Mgl1 y TREM2 se observó un ligero incremento en los ratones administrados con el extracto. Las barras de error representan la media  $\pm$  el error estándar de por lo menos dos mediciones.

## VIII. Discusión

Una de las características de la enfermedad de Alzheimer es la deposición del péptido  $\beta$ A. De acuerdo con la hipótesis amiloide, la acumulación del  $\beta$ A en el cerebro es uno de los factores principales de la patogénesis de la EA (Hardy and Selkoe, 2002). Adicionalmente, en los últimos años se ha sugerido que la inflamación puede contribuir a la progresión de la enfermedad de Alzheimer, ya que se ha observado que las células de la microglía liberan mediadores pro-inflamatorios que contribuyen a la degeneración de las neuronas (Heneka y O'Banion, 2007), adicionalmente se ha observado que el exceso de la liberación de citocinas pro-inflamatorias, contribuye al deterioro de la capacidad fagocítica de la células de la microglía (Hickman *et al.*, 2008).

Por lo que sea ha propuesto que el aclaramiento del  $\beta$ A en el cerebro y el uso de anti-inflamatorios, podrían ser consideradas como estrategias importantes para prevenir y tratar la EA.

El uso de extractos de plantas que contienen compuestos polifenólicos o flavonoides han tenido una importancia farmacológica en la EA, debido a sus diferentes propiedades anti-inflamatorias, anti-oxidantes y entre otras (Costa *et al.*, 2016). Por lo que, las diferentes propiedades de estos compuestos pueden ayudar a mejorar la EA, a través de una disminución en la inflamación y un aumento en la capacidad fagocítica de células de la microglía.

Existen reportes del uso de extractos de *Malva parviflora* donde se le atribuyen propiedades anti-inflamatorias y anti-microbianas (Shale *et al.*, 2005). Adicionalmente, se le ha atribuido un efecto neuroprotector al mejorar el aprendizaje de ratones inyectados con el péptido  $\beta$ A (Aslam y Sial, 2014). En el presente estudio, se determinó el efecto anti-inflamatorio del EHA de *M. parviflora* sobre células de la microglía en ratones modelo de la EA 5xFAD.

De acuerdo con el análisis fitoquímico del EHA de *M. parviflora*, se determinó la presencia de ácido oleanólico, escopoletina, flavonoides y polifenoles. Estos compuestos tienen propiedades anti-inflamatorias y anti-oxidantes (Caltana, 2015; Panda *et al*, 2006; Gao *et al*, 2009). En un estudio el ácido oleanólico fue aislado de un extracto etanolico de la



planta *Aralia cordata*, se observó que tiene propiedades neuroprotectoras al; proteger la apoptosis cultivos primarios de neuronas corticales estimulados con el péptido  $\beta$ A, esto a través de inhibir la generación de especies reactivas de oxígeno y la liberación de glutamato (Cho *et al.*, 2009). Adicionalmente, en un estudio en células RAW 264.7 se observó que el ácido oleanólico inhibe la vía de NF- $\kappa$ B a través de atenuar de la expresión de Mafk (Hwang *et al.*, 2014). En el caso de escopoletina que es una cumarina, se ha demostrado tener propiedades anti-inflamatorias al disminuir la liberación de citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 a través de la inhibición de NF- $\kappa$ B en mastocitos (Moon *et al.*, 2007).

Por otra parte, otros estudios han demostrado que los flavonoides como Quercetina y Wogonina, inhiben significativamente la activación de NF- $\kappa$ B y AP-1 en células de la microglía activadas con LPS (Chen *et al.*, 2005b; Lee *et al.*, 2003). De acuerdo con la caracterización fitoquímica, los compuestos presentes en el EHA de *M. parviflora* podrían tener una función sinérgica en la acción anti-inflamatoria. Se corrobora su efecto anti-inflamatorio de los compuestos presentes en el EHA de *M. Parviflora* al disminuir la activación de NF- $\kappa$ B y AP-1 de manera dosis dependiente en macrófagos Raw blue. Adicionalmente, se observó una disminución en la activación de células de la microglía al atenuar la morfología ameboide que fue inducida por LPS. Estos resultados coinciden con los ya reportados por un grupo de investigadores, donde se demostro que el flavonoide luteolina induce la morfología ramificada. Sin embargo, cuando son tratadas con LPS la morfología cambia a una ameboidea que indica su activación. Interesantemente ellos observaron que cuando las células de la microglía son co-tratadas con LPS+Luteolina, disminuye su morfología ameboidea y aumenta la morfología ramificada, adicionalmente ellos observaron que luteolina aumenta los niveles de genes anti-inflamatorios (Dirscherl *et al.*, 2010).

Por otra parte, se ha reportado que un exceso en la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  provoca una baja regulación de receptores involucrados en la capacidad fagocítica de la microglía, lo que promueve la deposición del  $\beta$ A y por lo tanto a la contribución de la neurodegeneración (Hickman *et al.*, 2008). Adicionalmente, un grupo de investigadores demostró que las células de la microglía de

ratones 5xFAD de 6 meses de edad, pierden la capacidad de fagocitar el péptido  $\beta$ A, lo que promueve la formación de placas  $\beta$ A (Hellwig *et al.*, 2015).

En este estudio se observó, que existe una tendencia en la disminución de la capacidad fagocítica en las células de la microglía aisladas de ratones 5xFAD adultos de 8 y 10 meses de edad en comparación con los ratones silvestres. La comparación del porcentaje de fagocitosis no fue significativa, ya que al ser aisladas las células de la microglía fueron removidas del ambiente pro-inflamatorio y posiblemente esto contribuyo a una mejora en la actividad de las células de la microglía. Varios estudios han demostrado que el uso de compuestos o citocinas con efecto anti-inflamatorio, promueven la capacidad fagocítica de células de la microglía (El-Shimy *et al.*, 2015) (Koenigsknecht-Talboo y Landreth, 2005).

Basados en la propiedad anti-inflamatoria del EHA *M. Parviflora*, se decido demostrar si la capacidad fagocítica de células de la microglía de ratones 5xFAD adultos de 8 y 10 meses de edad puede ser restaurada por el EHA *M. parviflora*, ya que se observó un incremento significativo en el porcentaje de fagocitosis medido por su capacidad para internalizar bacterias. Estos datos indican que el EHA *M parviflora* regula la capacidad fagocítica de células de la microglía. Esta idea es apoyada por estudios previos en el grupo que demostraron que los ratones 5xFAD administrados con el EHA *M. parviflora*, muestran una menor deposición de placas  $\beta$ A en corteza e hipocampo (Tesis de Maestría Itzia Jimenez Ferrer, 2012). Por lo que se decidió corroborar los datos e interesantemente observamos una mayor deposición de células de la microglía alrededor de las placas, lo que nos sugiere que el EHA de *M. parviflora* podría estar promoviendo la fagocitosis de placas  $\beta$ A. Sin embargo, no hubo diferencia significativa en el marcador de fagocitosis TREM2 en corteza de ratones 5xFAD. Esto sugiere que es necesario buscar nuevas moléculas que estén involucradas en la regulación de la fagocitosis.

Adicionalmente se ha reportado que la respuesta inflamatoria en la EA incluye cambios en la morfología de la microglía que van desde una célula ramificada “reposo” hasta una con morfología ameboide “activada” (Glass *et al.*, 2010). De acuerdo con esto, los experimentos *in vitro* e *in vivo*, refuerzan el efecto anti-inflamatorio de los compuestos presentes en el EHA de *M. parviflora*, ya que se observó una disminución en la morfología

ameboide de células de la microglía y un incremento de la morfología ramifica en cultivos primarios de microglía que fueron estimulados LPS. Estos datos son apoyados por los experimentos *in vivo*, ya que se observó una disminución en la morfología ameboide y un incremento en la morfología ramificada de células de la microglía en la zona del hipocampo de ratones 5xFAD. Estos datos fueron corroborados al observar una disminución significativa en los niveles del marcador de activación pro-inflamatorio CD86 en células de la microglía de la corteza de ratones 5xFAD. Adicionalmente, varios grupos de investigación han reportado que la inhibición de marcadores M1 como CD86 en células de la microglía, pueden contribuir a una mayor capacidad fagocítica de células de la microglía, ya que se ha observado un incremento en la fagocitosis de oligómeros  $\beta$ A (El-Shimy *et al.*, 2015; Hjorth *et al.*, 2013).

Todavía no hay una terapia exitosa disponible para detener y revertir la neurodegeneración en la EA, pero las evidencias experimentales nos llevan a concluir que el mejor tratamiento para la EA, puede ser el consumo de compuestos con propiedades anti-inflamatorias. En este trabajo se demostró que el EHA de *M. parviflora* tiene compuestos con propiedades anti-inflamatorias, al disminuir significativamente la expresión del marcador pro-inflamatorio CD86 en células de la microglía de la corteza de ratones 5xFAD, adicionalmente en macrófagos Raw Blue se observó la inhibición de factores de transcripción NF- $\kappa$ B/AP-1, que están involucrados en la respuesta inflamatoria. Basados en antecedentes donde se ha observado que el exceso de mediadores pro-inflamatorios contribuye al deterioro de la capacidad fagocítica de la células de la microglía (Hickman *et al.*, 2008). Se propone que la inhibición de la respuesta inflamatoria por el EHA *M. parviflora* ayuda a la restauración de la capacidad fagocítica de células de la microglía de ratones adultos 5xFAD y por consiguiente puede atenuar el desarrollo de la EA.

## IX. Conclusiones

Dado a los resultados obtenidos podemos concluir:

Los cultivos primarios aislados están enriquecidos con células de la microglía y son funcionales al responder estímulos pro-inflamatorios.

El extracto hidroalcohólico de *Malva parviflora* tiene un efecto anti-inflamatorio al disminuir la activación de factores de transcripción (NF- $\kappa$ B y AP-1) relacionados con la respuesta inflamatoria.

El extracto hidroalcohólico de *M. parviflora* regular la activación de células de la microglía, al disminuir la morfología ameboide que se ha asociado a su estado de activación.

El extracto hidroalcohólico de *M. parviflora* promueve la organización del citoesqueleto y aumenta la capacidad fagocítica de células de la microglía de ratones neonatos CD1.

El extracto hidroalcohólico de *M. parviflora* restaura la capacidad fagocítica de células de la microglía de ratones 5xFAD.

El extracto hidroalcohólico de *M. parviflora* promueve la morfología ramificada de células de la microglía y aumenta las células de la microglía alrededor de las placas  $\beta$ A en corteza e hipocampo de ratones 5xFAD.

El extracto hidroalcohólico de *M. parviflora* tiene un efecto anti-inflamatorio al disminuir el fenotipo M1 en células de la microglía de la corteza de ratones 5xFAD.

## X. Perspectivas

A pesar de tener evidencias del efecto anti-inflamatorio del EHA *M. parviflora*, al disminuir la activación de factores de transcripción (NF- $\kappa$ B y AP-1) que están involucrados en la respuesta inflamatoria en macrófagos y atenuar la activación de células de la microglía al disminuir la morfología ameboidea de células de la microglía. Es necesario determinar niveles de mediadores pro-inflamatorios o anti-inflamatorios en los cultivos primarios de microglía y en ratones 5xFAD, así como también es necesario determinar otras posibles mecanismos sobre los cuales EHA *M. parviflora* está ejerciendo su efecto. Para ello, se propone determinar los niveles de moléculas que participan en la respuesta inmune como JNK, AKT, componentes del inflamasoma NALP3 (Caspasa 1, IL1 $\beta$ , ASC).

Anteriormente en el laboratorio se demostró el efecto neuroprotector del EHA de *M. parviflora* en ratones 5xFAD, al mejorar la capacidad cognitiva. Sin embargo, el mecanismo por el que el extracto ejerce la neuroprotección es desconocido. Por lo que, se considera que es necesario medir niveles de moléculas que estén involucradas en la neuroprotección y proceso de aprendizaje como CREB y BDNF en tejido de ratones 5xFAD.

Se tiene evidencias de que el EHA *M. parviflora* regula la capacidad fagocítica de cultivos primarios de microglía de ratones neonatos y ratones adultos 5xFAD. Adicionalmente, estos datos correlacionan con una disminución en la deposición de placas  $\beta$ A en la corteza e hipocampo de ratones 5xFAD. Se observó un aumento en células de la microglía alrededor de las placas  $\beta$ A. Por lo que consideramos, que es necesario determinar si el extracto, aumenta la capacidad fagocítica en las células de la microglía de ratones 5xFAD. Para ello se propone realizar tinciones en cortes histológicos de ratone 5xFAD y evaluar moléculas que están involucradas en el proceso de fagocitosis como CD68, así como también realizar contenciones en células de la microglía y un

anticuerpo específico que reconozca al péptido  $\beta$ A. De esta manera se determinara si las células de la microglía que están alrededor de las placas están fagocitando.

Finalmente proponemos determinar la concentración de los compuestos presentes en el extracto y determinar el efecto de compuestos únicos en células de la microglía y en ratones 5xFAD.

## **XI. Anexos**

### **XI.1. Generación del Extracto Hidroalcohólico de *Malva parviflora***

La extracción se realizó por maceración exhaustiva en etanol al 60%, toda la noche y fue colectado, y a partir de este macerado se generó el extracto hidroalcohólico. El extracto se concentró a presión reducida en un evaporador rotatorio, finalmente fue liofilizado. Se caracterizó en cuanto a sus propiedades farmacológicas y química. Por ensayos de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) se determinó la presencia de compuestos polifenólicos (Tesis de Maestría, Itzia Jimenez Ferre, 2012).

### **XI.2. Cultivo Primario**

Los cultivos primarios de microglía fueron obtenidos de cerebro total de ratón de 2 cepas diferentes CD1 (P1/P3) y adultos 5xFAD (5/8 meses). Los cerebros de neonatos fueron disectados y se removieron las meninges por rodamiento en papel filtro estéril, posteriormente se lavaron 2 veces con PBS, los cerebros limpios fueron triturados con tijeras. La digestión enzimática se realizó con una mezcla de Tripsina tipo III (0.25mg/ml) y DNasa tipo I (0.28 mg/ml) durante 30 min a 37°C (1 ml por cerebro). Para inhibir la reacción se agregó 500 ul de FBS y 100 ul de DNasa tipo I (por cada ml de la mezcla de digestión). La suspensión celular se dispersó con pipetas Pasteur de diferentes diámetros. Las células se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min, después se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en un 1 ml de medio DMEM/F12, suplementado al 10% FBS, 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina) y 1% de glutamina, finalmente se sembró una densidad de 2 cerebro por caja (100 mm<sup>2</sup>). A las 24h fueron lavados con PBS y se agregó medio fresco. Los cultivos mixtos (astroglía y microglía) fueron mantenidos durante 8 días. El aislamiento de la microglía se realizó por el método convencional, los cultivos fueron agitados a 200 rpm durante 5hrs a TA, con la finalidad de remover las microglías adherentes de la monocapa de astrocitos. La suspensión celular que contiene las microglías fue recolectada y centrifugada. El pellet fue resuspendió en medio suplementado y se dejaron 24hrs hasta su uso.

Para el cultivo de ratones adultos, los cerebro fueron disectados y triturados. La disociación del tejido se realizó con ayuda del kit Neural Tissue Dissociation Kits (P),

que contiene papaína, para eliminar el debris se utilizaron perlas magnéticas anti-debri Myelin Removal Beads II, finalmente se realizó el aislamiento de la microglía, por selección positiva con perlas magnéticas CD11b (Microglia) MicroBeads, las células fueron sembradas y se dejaron descansar durante una semana hasta su uso. Para el uso de cada Kit, se siguieron las instrucciones del proveedor. En ambos protocolos las células aisladas fueron sembradas y tratadas de acuerdo al experimento correspondiente.



### XI.3. Caracterización del Cultivo

#### 2.1 Metodología RT-PCR.

Se realizó la extracción de RNA total de los cultivos por el Método de Tiocianato de Guanidina, Fenol-Cloroformol (Chomczynki y Sacchi 1987). Se determinó su concentración en un equipo NanoDrop y se evaluó su integridad en un gel de agarosa al 0.07%. Para la reacción de la retrotranscripción (RT) se utilizó un 1 ug de RNA, en la Tabla 1 se enlistan los reactivos de la mezcla y la reacción se llevó a cabo durante 2 horas a 37°C. En la PCR se utilizó 1.5 ul de cDNA en 12.5 ul de mezcla de reacción ver Tabla 2. Las reacciones para cada marcador se llevaron a cabo en termociclador en la Fig. 5 y Tabla 3, se muestran las condiciones para cada oligo utilizado. Finalmente los productos fueron separados mediante un gel de agarosa al 2%.

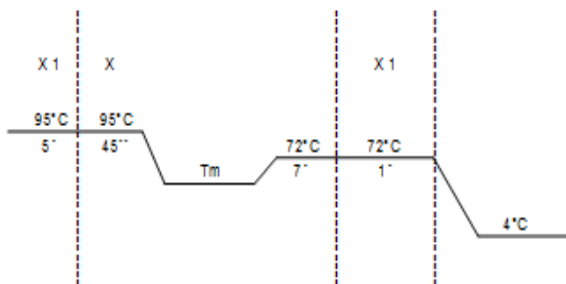
Tabla 1. Mezcla de Reacción para RT (12.5 ul)

Reactivo	1x
H <sub>2</sub> O DEPC	8.9 ul
Buffer RT	6 ul
DTT	3 ul
dNTPs	0.6 ul
Oligo dt	1 ul
Enzima RT	0.5 ul
RNA (1 ug)	12 ul en H <sub>2</sub> O DEPC

Tabla 2. Mezcla de Reacción para PCR

Reactivo	1x
H <sub>2</sub> O	8.25 ul
Buffer	1.25 ul
MgCl <sub>2</sub>	0.625 ul
dNTPs	0.25 ul
Oligo Forward	0.25 ul
Oligo Revers	0.25 ul
Amplificasa	0.125 ul
cDNA	1.5 ul

Fig. 15 y Tabla 3. Programas del termociclador para los diferentes oligos utilizados



Oligo	T <sub>m</sub>	Tiempo	# de Ciclos	Tamaño pb
Nef	58°C	45''	30	233
F4/80	64°C	1'	30	555
GFAP	68°C	1'	30	310
Actina	60°C	30''	27	238

## Inmunofluorescencia

Las células fueron fijadas con PFA al 4% durante 30 min y se lavaron 2 veces con PBS para eliminar cualquier resto del fijador, se permeabilizaron con tritón al 0.1% en PBS durante 30 min a TA y se lavaron 2 veces con PBS. El bloqueo se realizó con PBS-albumina al 10% por 1 hr a TA, las células se volvieron a lavar. Posteriormente se incubó con anti-F4/80 y anti-GFAP a una dilución 1:200 en el buffer de dilución que contiene PBS con albumina al 5% y tritón al 0.1% toda la noche a 4°C, posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS. Los núcleos fueron teñidos con DAPI en la oscuridad durante 15 min en PBS-tritón al 0.1% en una dilución 1:2000. Los anticuerpos secundarios se incubaron durante 1h en buffer de dilución, se utilizaron Alexa Flour 594 (Microglía) y Alexa Flour 488 (Astroglia) y se protegieron de la luz, posteriormente se hicieron 3 lavados, finalmente se agregó PBS y se analizaron en el Microscopio Confocal.

## Citometria de Flujo

En un tubo eppendorf se transfirió la suspensión celular (250000 cels), que fue colectada durante la agitación. Para parar el metabolismo celular se agregó 1 ml de solución Facs (Sol Facs Juice) al 2%. Las células fueron centrifugadas durante 5 min a 1200 rpm a 4°C, se eliminó el sobrenadante. El bloqueo se realizó por 30 min a 4°C con 50 ul de FBS diluidos en Facs (1:10), las células fueron centrifugadas nuevamente y el sobrenadante se decantado. La tinción de las células, se realizó con anti-CD11b acoplado a Alexa Flour 488 a una dilución 1:2000 en 100 ul de Sol Facs, se realizó su incubación en la oscuridad durante 20 min a 4°C, posteriormente se agregó 1 ml de Sol Facs y se centrifugo nuevamente. El pellet se resuspendió en 100 ul de Sol Facs y las células fueron fijadas con PFA al 4%. Finalmente se incubaron a 4°C protegidas de la luz, hasta ser pasadas por el citometro.

## **XI.4. Inmunofluorescencia de tejido**

Se realizaron co-tinciones en los tejidos, para visualizar las células de la microglía y las placas  $\beta$ A. Primero se marcaron cajas de 24 pozos para cada condición y se puso 500 ul de PBS-T para poner los cortes. Posteriormente se realizó la recuperación antigénica mediante calor usando citrato de sodio, para este paso se pusieron los cortes de cada

condición en un porta objetos con una gota de citrato de sodio, para generar el calor se puso la mitad de citrato de sodio en un vaso y se puso una caja de vidrio boca abajo, se calentó el microondas a una potencia de 7 durante 5 min, los tejidos se pusieron de vuelta en la caja de 24 pasos en PBS-T. Posteriormente incubo con la solución de bloqueo durante 1h a TA y se puso el anticuerpo primario anti-Iba1 en una solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Después del anticuerpo primario los tejidos se lavaron 3 veces con PBS-T. Se realizó la incubación del anticuerpo secundario acoplado a Alexa Fluor 5 en la solución de bloqueo durante 1h a TA, protegido de la luz y se volvió a lavar. Después se realizó la tinción con tioflavina S, el colorante de tioflavina S al 1%. Primero los cortes se pusieron en 5 min de colorante, posteriormente se realizaron lavados consecutivos: 10-30 seg de alcohol al 80%, 3 min de alcohol al 70% y 10 seg de agua destilada. Finalmente los cortes se montaron

Tabla 4. Soluciones para inmunofluorescencia

Soluciones	
PBS	
PBS-T	PBS 1x, 0.25% Tritón
Citrato de Sodio	10mM pH 6
Solución de Bloqueo	PBS 1x, 0.25% Tritón, 1% BSA
Tioflavina S al 1%	0.5 grs en 50 ml de agua destilada

## Referencias

- Abd-El-Basset, E., and S. Fedoroff (2004). Effect of bacterial wall lipopolysaccharide (LPS) on morphology, motility, and cytoskeletal organization of microglia in cultures. *J. Neurosci. Res.* *41*, 222–237.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* *124*, 783–801.
- Akiyama, H. (1994). Inflammatory Response in Alzheimer's Disease. *Thoku J. Exp. Med* *295*–303.
- Aslam, M., and Sial, A.A. (2014). Neuroprotective Effect of Ethanol Extract of Leaves of *Malva parviflora* against Amyloid- $\beta$  Mediated Alzheimer's Disease. *2014*.
- Association Alzheimer's (2015). 2015 Alzheimer's Disease Facts and Figures.
- Bamberger, M.E., Harris, M.E., McDonald, D.R., Husemann, J., and Landreth, G.E. (2003). A Cell Surface Receptor Complex for Fibrillar  $\beta$ -Amyloid Mediates Microglial Activation. *J. Neurosci.* *23*, 2665–2674.
- Bertram, L., Lill, C.M., and Tanzi, R.E. (2010). The genetics of Alzheimer disease: back to the future. *Neuron* *68*, 270–281.
- Biscaro, B., Lindvall, O., Tesco, G., Ekdahl, C.T., and Nitsch, R.M. (2012). Inhibition of microglial activation protects hippocampal neurogenesis and improves cognitive deficits in a transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *Neurodegener. Dis.* *9*, 187–198.
- Blaylock, R.L. (2013). Immunology primer for neurosurgeons and neurologists part I: Basic principles of immunology. *Surg. Neurol. Int.* *4*, 14.
- Breitner, J.C., and Zandi, P.P. (2001). Do nonsteroidal antiinflammatory drugs reduce the risk of Alzheimer's disease? *N. Engl. J. Med.* *345*, 1567–1568.
- Busciglio, J., Lorenzo, A., Yeh, J., and Yankner, B. a (1995).  $\beta$ -Amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding. *Neuron* *14*, 879–888.
- Chen, G., and Nuñez, G. (2010). Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 826–837.
- Chen, J., Zhou, Y., Mueller-Steiner, S., Chen, L.-F., Kwon, H., Yi, S., Mucke, L., and Gan, L. (2005a). SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid- $\beta$  toxicity through inhibiting NF- $\kappa$ B signaling. *J. Biol. Chem.* *280*, 40364–40374.
- Chen, J., Ho, F., Dawn, L.C.P., Chen, C., Jeng, K., Hsu, H., and Lee, S. (2005b). Inhibition of iNOS gene expression by quercetin is mediated by the inhibition of  $\kappa$ B kinase, nuclear factor- $\kappa$ B and STAT1, and depends on heme oxygenase-1 induction in mouse BV-2 microglia. *Eur. J. Pharmacol.* *521*, 9–20.

Cherry, J.D., Olschowka, J. a, and O'Banion, M.K. (2014). Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J. Neuroinflammation* 11, 98.

Chhor, V., Le Charpentier, T., Lebon, S., Oré, M.-V., Celador, I.L., Josserand, J., Degos, V., Jacotot, E., Hagberg, H., Sävman, K., et al. (2013). Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain. Behav. Immun.* 32, 70–85.

Cho, S.O., Ban, J.Y., Kim, J.Y., Jeong, H.Y., Lee, I.S., and Song, K. (2009). Full Paper *Aralia cordata* Protects Against Amyloid  $\beta$  Protein (25 – 35)– Induced Neurotoxicity in Cultured Neurons and Has Antidementia Activities in Mice. 32, 22–32.

Codolo, G., Plotegher, N., Pozzobon, T., Brucale, M., Tessari, I., Bubacco, L., and de Bernard, M. (2013). Triggering of inflammasome by aggregated  $\alpha$ -synuclein, an inflammatory response in synucleinopathies. *PLoS One* 8, e55375.

Colton, C.A., and Wilcock, D.M. (2010). Assessing activation states in microglia. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9, 174–191.

Colton, C. a, Mott, R.T., Sharpe, H., Xu, Q., Van Nostrand, W.E., and Vitek, M.P. (2006). Expression profiles for macrophage alternative activation genes in AD and in mouse models of AD. *J. Neuroinflammation* 3, 27.

Corraliza, I.M., Soler, G., Eichman, K., and Modolell, M. (1995). Arginase Induction by Suppressors of Nitric Oxide Synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in Murine Bone-Marrow-Derived Macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206, 667–673.

Costa, S.L., Silva, V.D.A., Dos Santos Souza, C., Santos, C.C., Paris, I., Muñoz, P., and Segura-Aguilar, J. (2016). Impact of Plant-Derived Flavonoids on Neurodegenerative Diseases. *Neurotox. Res.*

Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V, Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., and Gan, W.-B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat. Neurosci.* 8, 752–758.

Dirscherl, K., Karlstetter, M., Ebert, S., Kraus, D., Hlawatsch, J., Walczak, Y., Moehle, C., Fuchshofer, R., and Langmann, T. (2010). Luteolin triggers global changes in the microglial transcriptome leading to a unique anti-inflammatory and neuroprotective phenotype. *J. Neuroinflammation* 7, 3.

Elenkov, I.J., and Chrousos, G.P. (2002). Stress Hormones, Proinflammatory and Antiinflammatory Cytokines, and Autoimmunity. *Ann. NEW YORK Acad. Sci.* 966, 290–303.

El-Shimy, I.A., Heikal, O.A., and Hamdi, N. (2015). Minocycline attenuates A $\beta$  oligomers-induced pro-inflammatory phenotype in primary microglia while enhancing A $\beta$  fibrils phagocytosis. *Neurosci. Lett.* 609, 36–41.

Esfandiary, E., Karimipour, M., Mardani, M., Ghanadian, M., Alaei, H.A., Mohammadnejad, D., and Esmaeili, A. (2015). Neuroprotective effects of *Rosa damascena* extract on learning and memory in a rat model of amyloid- $\beta$ -induced Alzheimer's disease. *Adv. Biomed. Res.* 4, 131.

- Fellner, L., Irschick, R., Schanda, K., Reindl, M., Klimaschewski, L., Poewe, W., Wenning, G.K., and Stefanova, N. (2013). Toll-like receptor 4 is required for  $\alpha$ -synuclein dependent activation of microglia and astroglia. *Glia* 61, 349–360.
- Franchi, L., Eigenbrod, T., Muñoz-Planillo, R., and Nuñez, G. (2009). The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat. Immunol.* 10, 241–247.
- Freilich, R.W., Woodbury, M.E., and Ikezu, T. (2013). Integrated Expression Profiles of mRNA and miRNA in Polarized Primary Murine Microglia. *PLoS One* 8, e79416.
- Frohman, E.M., Racke, M.K., and Raine, C.S. (2006). Multiple Sclerosis — The Plaque and Its Pathogenesis. *N. Engl. J. Med.* 354, 942–955.
- Ghosh, S., Wu, M.D., Shafiq, S.S., Kyrkanides, S., LaFerla, F.M., Olschowka, J. a, and O'Banion, M.K. (2013). Sustained interleukin-1 $\beta$  overexpression exacerbates tau pathology despite reduced amyloid burden in an Alzheimer's mouse model. *J. Neurosci.* 33, 5053–5064.
- Glass, C.K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M.C., and Gage, F.H. (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 140, 918–934.
- Groves, E., Dart, A.E., Covarelli, V., and Caron, E. (2008). Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 1957–1976.
- Gu, Y., Luchsinger, J., Stern, Y., and Scarmeas, N. (2010). Mediterranean diet, inflammatory and metabolic biomarkers, and risk of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 22, 483–492.
- Haass, C., and Selkoe, D.J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 101–112.
- Halle, A., Hornung, V., Petzold, G.C., Stewart, C.R., Monks, B.G., Reinheckel, T., and Fitzgerald, K.A. (2008). The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-B. *Nat. Immunol.* 9, 857–865.
- Hanisch, U.-K., and Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* 10, 1387–1394.
- Hardy, J., and Allsop, D. (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci.* 12, 383–388.
- Hardy, J., and Selkoe, D.J. (2002). The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science* (80- ). 297, 353–256.
- Hellwig, S., Masuch, A., Nestel, S., Katzmarski, N., Meyer-Luehmann, M., and Biber, K. (2015). Forebrain microglia from wild-type but not adult 5xFAD mice prevent amyloid- $\beta$  plaque formation in organotypic hippocampal slice cultures. *Sci. Rep.* 5, 14624.
- Heneka, M.T., and O'Banion, M.K. (2007). Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J. Neuroimmunol.* 184, 69–91.

Heneka, M.T., Kummer, M.P., Stutz, A., Delekate, A., Schwartz, S., Vieira-Saecker, A., Griep, A., Axt, D., Remus, A., Tzeng, T.-C., et al. (2013). NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* 493, 674–678.

Heneka, M.T., Kummer, M.P., and Latz, E. (2014). Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 463–477.

Heneka, M.T., Carson, M.J., Khoury, J. El, Landreth, G.E., Brosseron, F., Feinstein, D.L., Jacobs, A.H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R.M., et al. (2015a). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 14, 388–405.

Heneka, M.T., Golenbock, D.T., and Latz, E. (2015b). Innate immunity in Alzheimer's disease. *16*, 229–236.

Hickman, S.E., Allison, E.K., and El Khoury, J. (2008). Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J. Neurosci.* 28, 8354–8360.

Hirsch, E.C., Vyas, S., and Hunot, S. (2012). Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 18, S210–S212.

Hjorth, E., Zhu, M., Toro, V.C., Vedin, I., Palmblad, J., Cederholm, T., Freund-Levi, Y., Faxen-Irving, G., Wahlund, L.-O., Basun, H., et al. (2013). Omega-3 fatty acids enhance phagocytosis of Alzheimer's disease-related amyloid- $\beta$ 42 by human microglia and decrease inflammatory markers. *J. Alzheimers. Dis.* 35, 697–713.

Holtzman, D.M., Morris, J.C., and Goate, A.M. (2011). Alzheimer's Disease: The Challenge of the Second Century. 3.

Hong, S., Dissing-Olesen, L., and Stevens, B. (2016). New insights on the role of microglia in synaptic pruning in health and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 36, 128–134.

Hoozemans, J.J.M., Veerhuis, R., Rozemuller, J.M., and Eikelenboom, P. (2006). Neuroinflammation and regeneration in the early stages of Alzheimer's disease pathology. *Int. J. Dev. Neurosci.* 24, 157–165.

Hu, X., Leak, R.K., Shi, Y., Suenaga, J., Gao, Y., Zheng, P., and Chen, J. (2015). Microglial and macrophage polarization—new prospects for brain repair. *Nat Rev Neurol* 11, 56–64.

Huh, Y., Jung, J.W., Park, C., Ryu, J.R., Shin, C.Y., Kim, W.-K., and Ryu, J.H. (2003). Microglial activation and tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigral region following transient focal ischemia in rats. *Neurosci. Lett.* 349, 63–67.

Hwang, Y., Song, J., Kim, H., and Hwang, K. (2014). Oleanolic acid regulates NF- $\kappa$ B signaling by suppressing MafK expression in RAW 264.7 cells. *BMB Rep* 47, 524–529.

Jian, L., Pu-yuan, W., Wen-wen, L., and Jun, Z. (2015). Upregulation effects of Tanshinone IIA on the expressions of NeuN, Nissl body, and I $\kappa$ B and downregulation effects on the expressions of GFAP and NF- $\kappa$ B in the brain tissues of rat models of Alzheimer's disease. *Neuroreport* 26, 758–766.

- Jin, J.-J., Kim, H.-D., Maxwell, J.A., Li, L., and Fukuchi, K.-I. (2008). Toll-like receptor 4-dependent upregulation of cytokines in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* 5, 23.
- Kierdorf, K., Erny, D., Goldmann, T., Sander, V., Schulz, C., Perdiguero, E.G., Wieghofer, P., Heinrich, A., Riemke, P., Hölscher, C., et al. (2013). Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat. Neurosci.* 16, 273–280.
- Kim, D.-C., Yoon, C.-S., Quang, T.H., Ko, W., Kim, J.-S., Oh, H., and Kim, Y.-C. (2016). Prenylated Flavonoids from *Cudrania tricuspidata* Suppress Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammatory Activities in BV2 Microglial Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 17.
- Kivipelto, M., Ngandu, T., Fratiglioni, L., Viitanen, M., Kåreholt, I., Winblad, B., Helkala, E.-L., Tuomilehto, J., Soininen, H., and Nissinen, A. (2005). Obesity and Vascular Risk Factors at Midlife and the Risk of Dementia and Alzheimer Disease. *JAMA Neurol.* 62.
- Kobayashi, K., Imagama, S., Ohgomori, T., Hirano, K., Uchimura, K., Sakamoto, K., Hirakawa, a, Takeuchi, H., Suzumura, a, Ishiguro, N., et al. (2013). Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death Dis.* 4, e525.
- Koenigsnecht-Talboo, J., and Landreth, G.E. (2005). Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid and IgGs are differentially regulated by proinflammatory cytokines. *J. Neurosci.* 25, 8240–8249.
- Kreutzberg, G.W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 19, 312–318.
- Lawson, L.J., Perry, V.H., Dri, P., and Riksn, S.G. (1990). HETEROGENEITY IN THE DISTRIBUTION AND MORPHOLOGY OF MICROGLIA IN THE NORMAL ADULT MOUSE BRAIN. 39, 151–170.
- Lee, C.Y.D., and Landreth, G.E. (2010). The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J. Neural Transm.* 117, 949–960.
- Lee, H., Kim, Y.O., Kim, H., Kim, S.Y., Noh, H.S., Kang, S.S., Cho, G.J., Choi, W.S., and Suk, K. (2003). Flavonoid wogonin from medicinal herb is neuroprotective by inhibiting inflammatory activation of microglia.
- Liu, S., Liu, Y., Hao, W., Wolf, L., Kiliaan, A.J., Penke, B., Rube, C.E., Walter, J., Heneka, M.T., Hartmann, T., et al. (2012). TLR2 is a primary receptor for Alzheimer's amyloid  $\beta$  peptide to trigger neuroinflammatory activation. *J. Immunol.* 188, 1098–1107.
- Liu, Y., Walter, S., Stagi, M., Cherny, D., Letiembre, M., Schulz-Schaeffer, W., Heine, H., Penke, B., Neumann, H., and Fassbender, K. (2005). LPS receptor (CD14): a receptor for phagocytosis of Alzheimer's amyloid peptide. *Brain* 128, 1778–1789.
- Lynn M. Bekris, Chang-En Yu, Thomas D. Bird, and D.W.T. (2010). Genetics of Alzheimer Disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 23, 213–227.



- Lyons, A., Downer, E.J., Crotty, S., Nolan, Y.M., Mills, K.H.G., and Lynch, M. a (2007). CD200 ligand receptor interaction modulates microglial activation in vivo and in vitro: a role for IL-4. *J. Neurosci.* *27*, 8309–8313.
- Maezawa, I., Zimin, P.I., Wulff, H., and Jin, L.-W. (2011). Amyloid- $\beta$  protein oligomer at low nanomolar concentrations activates microglia and induces microglial neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* *286*, 3693–3706.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* *25*, 677–686.
- Marcello, E., Epis, R., and Di Luca, M. (2008). Amyloid flirting with synaptic failure: towards a comprehensive view of Alzheimer's disease pathogenesis. *Eur. J. Pharmacol.* *585*, 109–118.
- Meireles, M., Marques, C., Norberto, S., Santos, P., Fernandes, I., Mateus, N., Faria, A., and Calhau, C. (2016). Anthocyanin effects on microglia M1/M2 phenotype: Consequence on neuronal fractalkine expression. *Behav. Brain Res.* *305*, 223–228.
- Michell-Robinson, M. a, Touil, H., Healy, L.M., Owen, D.R., Durafourt, B. a, Bar-Or, A., Antel, J.P., and Moore, C.S. (2015). Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. *Brain* *138*, 1138–1159.
- Minati, L., Edginton, T., and MG, B. (2009). Current concepts in Alzheimer's disease: a multidisciplinary review. *Am J Alzheimer Dis Other Demen* *24*, 95–121.
- Möller, T. (2010). Neuroinflammation in Huntington's disease. *J. Neural Transm.* *117*, 1001–1008.
- Moon, P.-D., Lee, B.-H., Jeong, H.-J., An, H.-J., Park, S.-J., Hyung-Ryong Kim, Seong-Gyu Koa, J.-Y.U., Hong, S.-H., and Kim, H.-M. (2007). Use of scopoletin to inhibit the production of inflammatory cytokines through inhibition of the I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B signal cascade in the human mast cell line HMC-1. *Eur. J. Pharmacol.* *555*, 218–225.
- Mosser, D.M. (2003). The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* *73*, 209–212.
- Nayak, D., Roth, T.L., and McGavern, D.B. (2014). Microglia development and function. *Annu. Rev. Immunol.* *32*, 367–402.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *308*, 1314–1319.
- Nixon, R. a., Wegiel, J., Kumar, A., Yu, W.H., Peterhoff, C., Cataldo, A., and Cuervo, A.M. (2005). Extensive Involvement of Autophagy in Alzheimer Disease: An Immuno-Electron Microscopy Study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *64*, 113–122.
- Panicker, N., Saminathan, H., Jin, H., Neal, M., Harischandra, D.S., Gordon, R., Kanthasamy, K., Lawana, V., Sarkar, S., Luo, J., et al. (2015). Fyn Kinase Regulates Microglial Neuroinflammatory Responses in Cell Culture and Animal Models of Parkinson's Disease. *J. Neurosci.* *35*, 10058–10077.

- Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., et al. (2011). Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. *Science* (80-. ). 333, 1456–1458.
- Paresce, D.M., Ghosh, R.N., and Maxfield, F.R. (1996). Microglial Cells Internalize Aggregates of the Alzheimer ' s Disease Amyloid B-Protein Via a Scavenger Receptor. *Neuron* 17, 553–565.
- Park, H.Y., Kim, G.-Y., and Choi, Y.H. (2012). Naringenin attenuates the release of pro-inflammatory mediators from lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia by inactivating nuclear factor- $\kappa$ B and inhibiting mitogen-activated protein kinases. *Int. J. Mol. Med.* 30, 204–210.
- Park, S.Y., Park, S.J., Park, N.J., Joo, W.H., Lee, S.-J., and Choi, Y.-W. (2013).  $\alpha$ -Iso-cubebene exerts neuroprotective effects in amyloid beta stimulated microglia activation. *Neurosci. Lett.* 555, 143–148.
- Pickford, F., Masliah, E., Britschgi, M., Lucin, K., Narasimhan, R., Jaeger, P.A., Small, S., Spencer, B., Rockenstein, E., Levine, B., et al. (2015). The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid  $\beta$  accumulation in mice. 118.
- Ponomarev, E.D., Novikova, M., Maresz, K., Shriver, L.P., and Dittel, B.N. (2005). Development of a culture system that supports adult microglial cell proliferation and maintenance in the resting state. *J. Immunol. Methods* 300, 32–46.
- Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretzschmar, H. a, and Herms, J. (2006). Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J. Neurosci.* 26, 7212–7221.
- Qin, H., Wilson, C. a., Roberts, K.L., Baker, B.J., Zhao, X., and Benveniste, E.N. (2006). IL-10 Inhibits Lipopolysaccharide-Induced CD40 Gene Expression through Induction of Suppressor of Cytokine Signaling-3. *J. Immunol.* 177, 7761–7771.
- Querfurth, H.W., and LaFerla, F.M. (2010). Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* 362, 329–344.
- Raivich, G. (2005). Like cops on the beat: the active role of resting microglia. *Trends Neurosci.* 28, 571–573.
- Reed-Geaghan, E.G., Savage, J.C., Hise, A.G., and Landreth, G.E. (2009). CD14 and toll-like receptors 2 and 4 are required for fibrillar A $\beta$  -stimulated microglial activation. *J. Neurosci.* 29, 11982–11992.
- Refolo, L.M., Pappolla, M.A., Malester, B., LaFrancois, J., and Bryant-Thomas, T. (2000). Hypercholesterolemia Accelerates the Alzheimer's Amyloid Pathology in a Transgenic Mouse Model. *Neurobiol. Dis.* 7, 321–331.
- Rogers, J. (2008). The inflammatory response in Alzheimer's disease. *J. Periodontol.* 79, 1535–1543.

Schafer, D.P., Lehrman, E.K., Kautzman, A.G., Koyama, R., Mardinly, A.R., Yamasaki, R., Ransohoff, R.M., Greenberg, M.E., Barres, B. a, and Stevens, B. (2012). Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74, 691–705.

Schmid, C.D., Melchior, B., Masek, K., Puntambekar, S.S., Danielson, P.E., Lo, D.D., Sutcliffe, J.G., and Carson, M.J. (2009). Differential gene expression in LPS/IFN $\gamma$  activated microglia and macrophages: in vitro versus in vivo. *J. Neurochem.* 109 *Suppl* , 117–125.

Shale, T.L., Stirk, W. a, and van Staden, J. (2005). Variation in antibacterial and anti-inflammatory activity of different growth forms of *Malva parviflora* and evidence for synergism of the anti-inflammatory compounds. *J. Ethnopharmacol.* 96, 325–330.

Singhal, G., Jaehne, E.J., Corrigan, F., Toben, C., and Baune, B.T. (2014). Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: a focused review. *Front. Neurosci.* 8, 1–13.

Steiner, H., Haass, C., and Butenandt-institute, A. (2000). INTRAMEMBRANE PROTEOLYSIS BY PRESENILINS. 1.

Stevens, B., Allen, N.J., Vazquez, L.E., Howell, G.R., Christopherson, K.S., Nouri, N., Micheva, K.D., Mehalow, A.K., Huberman, A.D., Stafford, B., et al. (2007). The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 131, 1164–1178.

Stewart, C.R., Stuart, L.M., Wilkinson, K., van Gils, J.M., Deng, J., Halle, A., Rayner, K.J., Boyer, L., Zhong, R., Frazier, W. a, et al. (2010). CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat. Immunol.* 11, 155–161.

Streit, W.J. (2002). Microglia as Neuroprotective , Immunocompetent Cells of the CNS. 139, 133–139.

Suh, Y., and Checler, F. (2002). Amyloid Precursor Protein , Presenilins , and  $\alpha$ -Synuclein : Molecular Pathogenesis and Pharmacological Applications in Alzheimer ' s Disease. 54, 469–525.

Tahara, K., Kim, H.-D., Jin, J.-J., Maxwell, J.A., Li, L., and Fukuchi, K. (2006a). Role of toll-like receptor signalling in Abeta uptake and clearance. *Brain* 129, 3006–3019.

Takahashi, K., Rochford, C.D.P., and Neumann, H. (2005). Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *J. Exp. Med.* 201, 647–657.

Takeda, S., Sato, N., Uchio-Yamada, K., Sawada, K., Kunieda, T., Takeuchi, D., Kurinami, H., Shinohara, M., Rakugi, H., and Morishita, R. (2010). Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and Abeta deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 7036–7041.

Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805–820.

- Takeuchi, H., Jin, S., Wang, J., Zhang, G., Kawanokuchi, J., Kuno, R., Sonobe, Y., Mizuno, T., and Suzumura, A. (2006). Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *J. Biol. Chem.* *281*, 21362–21368.
- Tanzi, R.E. (2012). The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *2*, 1–10.
- Taylor, P.R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H.-H., Brown, G.D., and Gordon, S. (2005). Macrophage receptors and immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 901–944.
- Tong, L., Prieto, G.A., Kramár, E. a, Smith, E.D., Cribbs, D.H., Lynch, G., and Cotman, C.W. (2012). Brain-derived neurotrophic factor-dependent synaptic plasticity is suppressed by interleukin-1 $\beta$  via p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Neurosci.* *32*, 17714–17724.
- Turner, P.R., O'Connor, K., Tate, W.P., and Abraham, W.C. (2003). Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog. Neurobiol.* *70*, 1–32.
- Udan, M.L.D., Ajit, D., Crouse, N.R., and Nichols, M.R. (2008). Toll-like receptors 2 and 4 mediate A $\beta$ (1-42) activation of the innate immune response in a human monocytic cell line. *J. Neurochem.* *104*, 524–533.
- Vargas, D.L., Nascimbene, C., Krishnan, C., Zimmerman, A.W., and Pardo, C. a (2005). Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann. Neurol.* *57*, 67–81.
- Walter, S., Letiembre, M., and Liu, Y. (2007). Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Cell. Physiol. ...* *20*, 947–956.
- Wang, Y.-J., Thomas, P., Zhong, J.-H., Bi, F.-F., Kosaraju, S., Pollard, A., Fenech, M., and Zhou, X.-F. (2009). Consumption of grape seed extract prevents amyloid-beta deposition and attenuates inflammation in brain of an Alzheimer's disease mouse. *Neurotox. Res.* *15*, 3–14.
- Yang, C.-N., Shiao, Y.-J., Shie, F.-S., Guo, B.-S., Chen, P.-H., Cho, C.-Y., Chen, Y.-J., Huang, F.-L., and Tsay, H.-J. (2011). Mechanism mediating oligomeric A $\beta$  clearance by naïve primary microglia. *Neurobiol. Dis.* *42*, 221–230.
- Zhang, W., Wang, T., Pei, Z., Miller, D.S., Wu, X., Block, M.L., Wilson, B., Zhang, W., Zhou, Y., Hong, J.-S., et al. (2005). Aggregated  $\alpha$ -synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J.* *19*, 533–542.
- Zhao, X., Wang, H., Sun, G., Zhang, J., Edwards, N.J., and Aronowski, J. (2015). Neuronal Interleukin-4 as a Modulator of Microglial Pathways and Ischemic Brain Damage. *J. Neurosci.* *35*, 11281–11291.
- Zheng, L.T., Ock, J., Kwon, B.-M., and Suk, K. (2008). Suppressive effects of flavonoid fisetin on lipopolysaccharide-induced microglial activation and neurotoxicity. *Int. Immunopharmacol.* *8*, 484–494.

