

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA



TESIS DE GRADO

**RESPUESTA DE LAS CITOCINAS IL-10 Y TGF- β
A LA INYECCIÓN INTRAHIPOCAMPAL
IN VIVO DE LA PROTEÍNA β -AMILOIDE EN RATAS**

Alumna

Sandra Gabriela Martínez Barboza

Director de Tesis

Dr. en C. Sergio Alberto Rosales Corral

Guadalajara, Jalisco. Enero del 2003

186697/005
B345/024734
91



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

**C. SANDRA GABRIELA MARTÍNEZ BARBOZA
PRESENTE.**

Manifiestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES opción Tesis** con el título **"RESPUESTA DE LAS CITOCINAS IL-10 Y TGF- β A LA INYECCIÓN INTRAHIPOCAMPAL *IN VIVO* DE LA PROTEÍNA β -AMILOIDE EN RATAS "**, para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado/a como Director de dicho trabajo el/la **DR. SERGIO ALBERTO JESÚS ROSALES CORRAL** y como Asesor el/la **DRA. GALINA PETROVNA ZAITSEVA**.

**ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"**

"2002, Año Constanancio Hernández Alvirde"

Las Agujas, Zapopan, Jalisco, 14 de noviembre del 2002

**DRA. MÓNICA ELIZABETH RIVERA LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

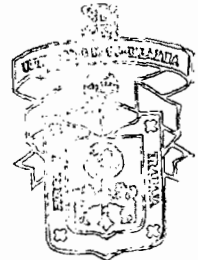
COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Leticia Hernández López
**M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

c.c.p. **DR. SERGIO ALBERTO JESÚS ROSALES CORRAL**.-Director del Trabajo.
c.c.p. **DRA. GALINA PETROVNA ZAITSEVA**.-Asesor del Trabajo.
c.c.p. Expediente del alumno

MERL/LHL/mam

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

**C. DRA MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN
DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
PRESENTE.**

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó el (la) pasante:

(Codigo 394366518) Sandra Gabriela Martínez Barboza titulado

"RESPUESTA DE LAS CITOCINAS IL-10 Y TGF- β A LA INYECCION

INTRAHIPOCAMPAL IN VIVO DE LA PROTEINA B-AMILOIDE EN RATAS"

Consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de exámenes de tesis y profesional respectivos.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarte un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Zapopan, Jal., a 21 de Enero del 2003

EL DIRECTOR DE TESIS

Dr. Sergio Rosales Corral



SINORALES

COORDINACION DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA

EL ASESOR

Dra. Galina Zaitseva

1. **Mónica Elisa Ureña Guerrero**
2. **Eduardo Vázquez Valls**
3. **Alfonso Enrique Islas Rodríguez**
4. **Graciela Gudiño Cabrera (Suplente)**

[Firmas manuscritas de los asesores]

16/01/03

RESPUESTA DE LAS CITOCINAS IL-10 Y TGF- β
A LA INYECCIÓN INTRAHIPOCAMPAL
***IN VIVO* DE LA PROTEÍNA β -AMILOIDE EN RATAS**

Pasante en Biología

Sandra Gabriela Martínez Barboza

Laboratorio de Desarrollo Envejecimiento

División de Neurociencias

Centro de Investigación Biomédica de Occidente

IMSS

Director

Dr. en C. Sergio Alberto Rosales

Laboratorio de Desarrollo y Envejecimiento

División de Neurociencias

Centro de Investigación Biomédica de Occidente. IMSS

Asesor:

Dr. en C. Galina Petrovna Zaitseva

Departamento Biología celular y molecular

CUCBA U de G

Agradecimientos

A mis padres
por su apoyo y comprensión

A mi esposo
por su amor y paciencia

A mi director
por brindarme la mano

ABREVIATURAS

ACT	α -1-antiquimiotripsina
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
Ac	Anticuerpo
β A	Beta amiloide
β Af	Beta amiloide fibrilar
β Ad	Beta amiloide desordenado
β -APP	Proteína precursora del β A
b-FGF	Factor de crecimiento básico de los fibroblastos
DAB	Diaminobenzidina
EA	Enfermedad de Alzheimer
EAE	Encefalomiелitis alérgica experimental
ELISA	Enzyme-linked-immunoadsorbent-assay
GM-CSF	Factor estimulante del crecimiento de granulocitos y macrófagos
IGF-1	Factor de crecimiento tipo 1 semejante a la insulina
IkB	Inhibidor de NF-kB
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LPS	Lipopolisacárido
LTP	Potenciación a largo plazo
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MHC II	Complejo mayor de histocompatibilidad tipo II
NF-kB	Factor nuclear kappa B
NK	Natural killer
NMDA	N-metyl-D-aspartato
NO	Oxido nítrico
PBS	Tampon salino de fosfatos
PTA	Tritón-Albúmina en PBS
PS-1	Presenilina 1
RAGE	Receptores para productos terminales en estado de glicosilación avanzada
ROS	Especies reactivas de oxígeno
sAPP	Proteína precursora soluble del amiloide
SNC	Sistema nervioso central
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreto
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa

RESUMEN

Uno de los papeles de la proteína β -amiloide (β A) es inducir en el sistema nervioso central (SNC) eventos inflamatorios asociados con placas seniles. Varios estudios han implicado a las citocinas pro- y anti-inflamatorias en la Enfermedad de Alzheimer, tales como, la interleucina 1 (IL-1), la interleucina 6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) el factor de crecimiento transformante (TGF- β) y la Interleucina 10 (IL-10).

En el presente trabajo examinamos el efecto del fragmento completo de 1 a 42 aminoácidos (a.a.) del péptido β A sobre la producción de las citocinas anti-inflamatorias TGF- β e IL-10. Se evaluó la expresión de estas citocinas en un modelo de estudio con ratas Wistar, machos (280-300 g) bajo la inducción *in vivo* de una respuesta inflamatoria por la inyección intrahipocampal de la proteína β A sobre la región CA1 del hipocampo.

Los resultados muestran la presencia de la proteína β A hasta 21 días después de su inyección, en la zona donde se aplicó, las zonas circunvecinas y propiamente en la región CA1 del hipocampo. Nuestros resultados demuestran un nivel del TGF- β por debajo de los niveles basales observados en animales intactos a las 12, 24 y 48 h, después de la aplicación del β A, lo que se debe posiblemente a su actividad pro-inflamatoria predominante. A partir de las 48 h, las concentraciones de TGF- β se incrementan hasta las 72 h, probablemente como una reacción compensatoria y presenta un descenso a partir de las 84 h.

Reconocida la enfermedad de Alzheimer como un problema de salud pública, es importante conocer las causas que la producen, para así contribuir a encontrar soluciones, de ahí parte nuestra búsqueda de un modelo para comprender la enfermedad y explorar nuevas terapéuticas.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza por una neurodegeneración lenta y progresiva asociada con placas seniles (depósitos de una proteína insoluble llamada proteína β -amiloide (βA), que actúa como centro de degeneración neuronal; estas placas se encuentran en las estructuras intracerebrales involucradas en la memoria y el control emocional) y en ovillos neurofibrilares (conformados por una proteína del citoesqueleto modificada, la proteína tau; la cual distorsiona la arquitectura de los neurotúbulos y micro filamentos a tal punto de impedir el flujo axonal) (Chui y col., 1996). La distribución de la lesión depende de la edad y de las características morfológicas y neuroquímicas específicas de las subpoblaciones neuronales susceptibles. Las alteraciones patológicas tempranas están restringidas a la región del hipocampo (Ball, 1977) región entorrinal (Hyman y col., 1984) y neocorteza (Terry y col., 1981). En dicha enfermedad, el factor predominante de daño es un péptido de 40 a 42 aminoácidos (aa), denominado proteína β -amiloide en su forma fibrilar (βAf), el cual proviene de una molécula denominada proteína precursora del β -amiloide (βAPP). Tanto la proteína βA y βAPP (Ronaldo y Falcon, 1998) son habituales en bajas concentraciones en líquidos biológicos, tanto en individuos sin patología, como en aquellos que tienen EA, pero en estos últimos, pierden su solubilidad, agregándose ordenadamente en forma de fibras que se depositan en el cerebro. Diversos factores parecerían tener importancia para esta agregación: 1) Mutaciones de la presenilina (PS) 1 y 2 (involucradas en los mecanismos de tránsito intracelular de vesículas hacia la membrana plasmática), en donde la acumulación de presenilinas en el retículo endoplásmico alteraría el procesamiento normal de βAPP , resultando en una mayor producción de βA ; 2) Apolipoproteína E (Apo E), la cual juega un papel en el movimiento y distribución de colesterol de las células nerviosas en reparación durante el

desarrollo y después de la lesión y se une a βA , favoreciendo la formación de fibrillas. Apo E se ha estudiado durante años como un factor de riesgo genético en la EA (Bookheimer y Susan, 2000).

La proteína βA tiene la característica de inducir *per-se* daño oxidativo, al interactuar con receptores específicos en microglía, astrocitos y neuronas (El khoury y cols., 1996). Pero al mismo tiempo activa a las células microgliales y éstas, como macrófagos residentes del SNC, inician una respuesta basada en la sobreproducción de radicales libres, particularmente óxido nítrico y citocinas pro-inflamatorias, como la IL-1 β , el TNF- α y la IL-6 (Ishii y cols., 2000; Mehlhorn y cols., 2000). La cronicidad del estímulo convierte la respuesta antes mencionada en un factor patogénico que genera mayor acumulo de βA , mayor producción de radicales libres y ambos factores, llevan a una expresión más elevada de citocinas pro-inflamatorias; de este modo, se genera un círculo vicioso de daño y degeneración (Markesbery, 1999). El papel de las citocinas anti-inflamatorias, como la IL-10 y el TGF- β , pudiera ser relevante, en cuanto a la posibilidad de contrarrestar el daño neuroinflamatorio instalado en forma crónica. Sin embargo, existen algunas informaciones contradictorias en este sentido. Por ejemplo, se ha demostrado que, en animales transgénicos, el TGF- β promueve los depósitos vasculares de amiloide en la angiopatía amiloidea cerebral (Greenberg y col., 2000), y en la propia EA (Wyss-Coray y col., 2000). Esto, en contraposición al conocido efecto neuroprotector, anti-inflamatorio reconocido para el TGF- β , el cual producido por los astrocitos regula la producción de citocinas inflamatorias en el cerebro, estas últimas derivadas predominantemente de la actividad microglial, contribuyendo así al control de la sobreproducción de TNF- α , al igual que lo hace la IL-10 (Benveniste y col., 1994).

Con el propósito de evaluar la respuesta de las citocinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF- β , por la aplicación *in vivo* e *in situ* de la proteína βA , en el presente estudio se realizó una curva cinética de tiempo para éstas después de la inyección de la proteína βA (12, 24, 48, 60, 72 y 84 h).



ANTECEDENTES

Relación de la proteína β -amiloide con la producción de interleucinas pro inflamatorias

La EA es una enfermedad neurodegenerativa, progresiva, caracterizada por placas amiloides y pérdida o disfunción de neuronas. Es la causa más común de deterioro intelectual en el envejecimiento. Los cerebros de pacientes con EA contienen numerosas placas de amiloide rodeadas por neuritas distróficas, y que muestran una pérdida de sinapsis, formación de marañas neurofibrilares y gliosis (Games y col., 1995). De acuerdo con la "teoría amiloide", el factor que inicia y promueve la enfermedad de Alzheimer es el péptido β A (Yankner 1996). Esta teoría emergió y se consolidó en la década de 1990 y se fundamenta, por una parte, en la asociación que existe entre la proteína β A y las neuronas degeneradas en la EA, así como en la relación demostrada entre las mutaciones en líneas celulares de la proteína precursora del β A (β -APP) con algunas formas hereditarias de EA (Citron y col., 1997). Por otra parte, la teoría se consolida con la demostración de que esas mutaciones incrementan la producción de la proteína β A típica o de formas más alargadas y amiloidogénicas (β -A₁₋₄₂) (Citron y col., 1997). Estudios con animales y en cultivos celulares que caracterizan los efectos de las mutaciones de la EA familiar también apoyan la hipótesis de la proteína β A.

Más importantes aún son los trabajos con ratones transgénicos expresando genes β -APP que exhiben algunas de las características del fenotipo Alzheimer incluyendo placas neuríticas y déficit de la memoria dependiente de la edad (Games y col., 1995; Hsiao y col., 1996; Masliah y col., 1998; Nalbantoglu y col., 1997; Sturchler-Pierrat y col., 1997).

La proteína β A es uno de los factores protagónicos en la fisiopatogenia de la enfermedad de Alzheimer y su papel no se restringe exclusivamente a una actividad oxidativa *per se*, sino también al estímulo de la respuesta neuroinmune a cargo de los astrocitos y de las células microgliales (Bauer y col., 1991), células inmunoefectoras residentes del cerebro, las cuales son crónicamente estimuladas a lo largo del proceso neurodegenerativo y pueden tener un papel clave en el estrés inflamatorio asociado con las placas amiloideas (Yan y col., 1996).

El péptido β A promueve la apoptosis neuronal en la EA (Zhu y col., 2000). Al estudiar tejido cerebral de pacientes con EA se han descubierto evidencias morfológicas y bioquímicas de apoptosis neuronal, incluyendo fragmentación del DNA; activación de caspasas; y niveles incrementados de proteínas relacionadas con apoptosis en asociación con los depósitos de la proteína β A (Masliah y col., 2001; Chan y col., 1999).

Estudios previos han demostrado que la proteína β A puede inducir la producción de citocinas pro- y anti-inflamatorias (Meda et al., 1995a,b; Goodwin et al., 1996;

London y col., 1996) las cuales juegan un importante papel en la patogénesis de la EA (Eikelenboom y col., 1994; Rogers, 1995; McGeer y col., 1996).

A partir de todas estas evidencias, nos enfocamos al estudio experimental de un fenómeno en particular: la producción de citocinas anti-inflamatorias en relación con la proteína β A.

La proteína β A proviene de una molécula mucho más grande denominada β -APP, la cual está relacionada con funciones de plasticidad y cito-protección durante el desarrollo (Clarris y col., 1995; Mattson, 1997). La fragmentación de la proteína precursora representa un papel clave en la generación de la proteína β A (Zhong y col., 1994, Higaki y col., 1995). La proteólisis de β -APP es parte del metabolismo celular normal y da lugar a fragmentos peptídicos solubles, fácilmente degradables. La proteína β A es un péptido derivado, degradativo y no obligatorio del catabolismo de β -APP; y surge, precisamente, por un mecanismo aberrante de fragmentación (da Cruz y col., 1993). Tanto la proteína β A como la proteína precursora soluble del amiloide (sAPP) son secretados por una variedad de células y han sido encontrados en líquido cefalorraquídeo (LCR) humano (da Cruz y col., 1993). En el cerebro de pacientes con Alzheimer la proteína β A soluble se encuentra con niveles más elevados, que en los cerebros de personas sanas de la misma edad (Guo y col., 1998).

Los péptidos que contienen la secuencia de 40 a 42 aminoácidos de la proteína β A y sus derivados más cortos, forman fibrillas semejantes al amiloide *in vitro*, y

son morfológica, inmunológica, espectroscópica y ultraestructuralmente similares a las fibrillas extraídas de las placas de pacientes con Alzheimer (Selkoe, 1989; Tomita y col., 1998). La conformación de la proteína β A en forma de hojas beta-plegadas parece ser formada por dos hebras β antiparalelas que involucran a los fragmentos 12-24 y 24-48 del amiloide, con una vuelta β alrededor de la región 25-47 (Soto y col., 1994; Teplow, 1998). Esta conformación lo más probable es que resulte inestable en solución acuosa debido a que los residuos hidrofóbicos quedan expuestos al solvente y se estabilizan al formar agregados, lo cual da lugar a oligómeros de hojas β y finalmente, a fibrillas amiloideas (Soto y col., 1994; Teplow, 1998).

La proteína β A se produce en una forma monomérica soluble y de ese modo circula a niveles bajos en el LCR y la sangre. En la vejez y mucho más en EA, el β A tiene la capacidad de formar agregados fibrilares insolubles. Esos agregados son los que se asocian con la degeneración neuronal y la activación de la microglía en el cerebro de los pacientes con EA. En estudios con cultivos celulares, se ha demostrado que el proceso de formación de fibrillas está estrechamente correlacionado con la capacidad del β A para dañar neuronas y activar la microglía (Mattson y Rydell, 1996).

La microglía se adhiere fuertemente al β -amiloide fibrilar (β Af) a través de los receptores para productos terminales en estado de glicosilación avanzada (RAGE, por sus siglas en inglés) y de los receptores barredores o "scavengers", de este

modo se ha propuesto que el β Af puede inducir la activación de la microglia. La microglia activada produce sustancias potencialmente neurotóxicas como las especies reactivas de oxígeno (ROS) y excitotoxinas (McGeer y McGeer, 1995, Hensley y col., 1994, Butterfield y col., 1994). Pero la microglia activada y los astrocitos también producen sustancias neuroprotectoras como TGF- β y el factor de crecimiento básico de los fibroblastos (b-FGF).

Los depósitos de β Af ejercen un estímulo constante sobre las células de la microglía y por sí solos pueden ser suficientes para inducir una liberación crónica de óxido nítrico y citocinas proinflamatorias (Ishii y col., 2000; Mehlhorn y col., 2000).

Papel de las interleucinas en el sistema nervioso central, particularmente de las interleucinas anti-inflamatorias.

Durante los pasados 10 años, los inmunólogos han desarrollado el concepto de que las citocinas guardan un equilibrio entre pro-inflamatorias y anti-inflamatorias (Venters y col., 2000). Este sistema de balance entre proteínas de señalización intercelular se encuentra activo durante las enfermedades neurodegenerativas en el cerebro, decidiendo el destino final de las neuronas.

Se conoce, que virtualmente todas las células del sistema nervioso central (SNC), incluyendo neuronas, tienen la capacidad de sintetizar citocinas pro-inflamatorias, como el TNF- α y la IL-1 (Hopkins y Rothwell, 1995; Kronfol y Remick, 2000) aunque la mayoría de las citocinas son secretadas por astrocitos y microglia.

Se ha demostrado que los niveles de IL-1, IL-6, y TNF- α se mantienen elevados tanto en el suero como en los extractos de pacientes con EA (Abraham y col., 1988; Griffin y col., 1989). Tanto IL-1 como IL-6 incrementan la síntesis de β -APP (Bauer y col., 1992; Altstiel y Sperber, 1991). La desregulación inmune que involucra a las citocinas pro-inflamatorias IL-1, TNF- α e IL-6 ha sido implicada en las condiciones neurodegenerativas y la patofisiología de la EA (Gitter y col., 1995, Brugg y col., 1995, Baskin y col., 1997; Dash y Moore, 1995; Grili y col., 1996; McGeer y Rogers, 1992).

La IL-1 promueve la formación de placas neuríticas e induce inflamación crónica. Al ser sobreexpresado IL-1 estimula la producción y el procesamiento de β -APP e incrementa los niveles de α -1-antiquimiotripsina (ACT) (Lieb y col., 1996). Tanto IL-1 como TNF- α estimulan la producción de ACT mediante la activación del factor nuclear kB (NF-kB) en células de astrocitoma (Lieb y col., 1996; Lanzrein y col., 1998).

De manera recíproca, la proteína β A es capaz de elevar la liberación de IL-1 funcional a partir de macrófagos/microglia, que pueden a su vez estimular la producción de TNF- α . La cascada inflamatoria se continúa por el estímulo que IL-1 y TNF- α ejercen sobre la producción de prostaglandina E2 mediante el incremento en la expresión de histamina (Gitter y col., 1995, Hom y col., 1995, Brugg y col., 1995, Baskin y col., 1997; Dash y Moore, 1995, Grilli 1996; McGeer y Rogers., 1992). IL-1 y TNF- α pueden también potenciar el daño isquémico cerebral (Lackey y col., 2000). Pero la visión de estas citocinas únicamente como mediadores inflamatorios involucrados en procesos patofisiológicos debe ampliarse, pues IL-1 y TNF- α son sustancias neuromoduladoras, que regulan funciones como el sueño, la alimentación, la actividad electrofisiológica, la expresión de genes y la potenciación a largo plazo (LTP) de la memoria (Vitkovic y col., 2000).



La interleucina 10

Es una proteína de 35-40 kDa, producida por linfocitos CD4, Th0, Th1, linfocitos B, mastocitos, eosinófilos, monocitos y macrófagos (Bluthé y col., 1999). Bloquea la producción de otras citocinas por células T (Kronfol y Remick 2000). Actúa como co-estimulador de la proliferación de mastocitos y linfocitos periféricos. Además de ser un coestimulador del crecimiento y la maduración en timocitos inmaduros, funcionando como un factor de diferenciación citotóxico de células T. Induce la secreción de IgG, IgA e IgM. Es un potente y específico quimioatrayente para linfocitos T y un potente activador de células B (Howard y O'Garra, 1992)

La IL-10 es una citocina pleiotrópica que inhibe la síntesis de un número de citocinas proinflamatorias, tales como IL-1, IL-6 y TNF- α bloqueando la transcripción de genes; es considerada como una citocina inmunosupresora y neuroprotectora (Dinarello 1997a; 1997b; Dinarello 2000; Masliah y col., 2001; Spera y col., 1998; Apelt y Schliebs, 2001; Bluthé y col., 1999; Szczepanik y col., 2001; de Waal Malefyt y col., 1991; Geng y col., 1994; Howard y O'Garra, 1992). Actúa de una manera autocrina y paracrina de tal manera que inhibe la inducción de moléculas de adhesión y síntesis de citocinas proinflamatorias por inhibición de la activación microglial (Lodge y Sriram 1996; Minghetti y col., 1998). Previene la presentación del antígeno de astrocitos y microglia (Frei y col., 1994;) y la encefalomiелitis alérgica experimental (EAE) en ratas (Rott y col., 1994; Williams y

cols; 1996). Actúa a nivel traduccional bloqueando el mRNA para TNF- α (Benveniste y col., 1994; Benveniste y col., 1995).

Estudios *in vitro* demuestran que la IL-10, inhibe la producción de varios mediadores proinflamatorios (Howard y O'Garra 1992; Kasai y col., 1997), así como también la síntesis microglial de IL-1, IL-6 y TNF- α (Chao y col., 1995; Frei y col., 1994; Mizuno y col., 1994). *In vivo*, IL-10 es expresada en células microgliales reactivas (Rott y col., 1994; Diab y col., 1997; Morganti-Kossmann y col., 1997; Zhai y col., 1997; Jander y col., 1998)

Su administración sistémica a dosis farmacológicas regula la producción y acción de citocinas proinflamatorias en el cerebro (Bluthé y col., 1999), mientras su aplicación local decrementa la activación microglial y la producción de TNF- α (Balasingam y Yong, 1996). Cuando se aplica de manera exógena actúa como una citocina anti-inflamatoria en el cerebro (Bluthé y col., 1999) en un modelo *in vivo* con inyección de lipopolisacárido (LPS).

La IL-10 tienen la capacidad de reducir la respuesta neuroinflamatoria y prevenir una respuesta neuroinflamatoria severa. IL-10 protege contra la toxicidad de la proteína β A y su carencia en respuesta a la proteína β A puede explicar la condición inflamatoria crónica ocurrida en EA en un modelo *In vitro* (Szczepanik y col., 2001).

El Factor de crecimiento transformante beta

Es un factor multifuncional ya que juega diversos papeles en el desarrollo de tejidos, crecimiento y diferenciación celular, homeostasis, saneamiento de heridas, reparación y angiogénesis (Syrris y col., 1998; Blobe y col., 2000; Roberts y Sporn 1996; Benveniste 1998). Es un quimioatrayente de linfocitos, granulocitos y fibroblastos en el lugar de la lesión (Letterio y Roberts, 1998; Lawrence, 1996).

Existen tres isoformas para TGF- β con un 70-80% de homología, pero el que existe en forma predominante es el TGF- β 1 (Finch y col., 1993). Puede existir asociado a una matriz extracelular como un complejo beta-glucano y decorina; lo que permite encontrarlo en forma inactiva; las formas activas de TGF- β son homodímeros ligados por enlaces disulfuro de 25-kDa (Roberts y Sporn 1996; Massague, 1998).

Es sintetizado por macrófagos, linfocitos, células endoteliales, queratinocitos, células granulosa, condrocitos, glioblastoma y células leucémicas. Es un potente inhibidor de crecimiento para células epiteliales transformadas y normales, células endoteliales, fibroblastos y células neuronales. Inhibe la proliferación de linfocitos T, el crecimiento de células "natural killer" (NK) y desactiva macrófagos. Asimismo, suprime la activación y proliferación de la microglia inducida por el factor estimulante del crecimiento de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) o del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y suprime la expresión del

complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC II). Pero, al mismo tiempo, modula la síntesis de proteínas de fase aguda por hepatocitos e inhibe la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) (COPE, <http://www.cope.cgi> 1999).

En el sistema inmune periférico TGF- β suprime la proliferación de células T y B e inhibe la producción de citocinas proinflamatorias, además bloquea ciertas enfermedades autoinmunes (Sun y col., 2000).

En SNC es expresado en astrocitos, microglia (Pasinetti y col., 1993; Finch y col., 1993; Morgan y col., 1993) y oligodendrocitos y desempeña un papel neuroprotector, además de contar con propiedades inmunosupresoras por la capacidad de inhibir la secreción de óxido nítrico (NO) por macrófagos activos (Weller y Fontana 1995; Alleva y col., 1994; Hausmann y col., 1994; Vodovotz y col., 1993), y al igual que IL-10 inhibe la síntesis de IL-1 y TNF- α . (Lagadec y col., 1999; Wyss-Coray y col., 1997; Masliah y col., 2001; Benveniste y col., 1995; Bluthé y col., 1999).

Modula la activación y función de células gliales y causa hipertrofia de astrocitos (Chao y col., 1992) al mismo tiempo que inhibe su proliferación (Vergelli y col., 1995), esto puede ser central en la formación de cicatrices gliales (Finch y col., 1993; Logan y col., 1994).

In vivo e *in vitro*, TGF- β induce la producción de proteínas de matriz extracelular, proteasas e inhibidores de proteasas (Tabla 1) (Ignotz y Massague, 1986; Roberts y col., 1986; Wyss-Coray y col., 1995), muchos de los cuales son depositados junto a las placas del β A (Finch y col., 1993; Kisilevsky, 1994; Leveugle y Fillit, 1994; McGeer y McGeer, 1995).

Se han reportado en pacientes post-mortem con EA niveles elevados de TGF- β en cerebro, LCR y suero (Dinarello, 2000; Wyss-Coray, 2000; Amara y col., 1999; Chao y col., 1994a,b) y ha sido detectado en placas seniles (Van der Wal y col., 1993, Flanders y col., 1995). La detección de TGF- β alrededor y sobre placas seniles de cerebros de pacientes con EA (Flanders y col., 1995, Peress y Perillo, 1995; Van der Wal y col., 1993) indica que los depósitos de la proteína β A puede además inducir mecanismos anti-inflamatorios que contrarregulan los eventos inflamatorios.

Estudios previos, han demostrado que actúa a nivel transcripcional mediante el bloqueo del mRNA para TNF- α y la expresión de proteínas por inhibición del gen de transcripción (Benveniste y col., 1994; Benveniste y col., 1995). La inhibición mediada de TGF- β sobre TNF- α ocurre de manera dosis y tiempo dependiente, con una inhibición óptima, observada cuando las células son pretratadas con TGF- β por 12-24 horas antes de inducir el estímulo. Aplicado de manera exógena, TGF- β inhibe la actividad de NF- κ B por incrementar la transcripción del factor inhibidor de NF- κ B (I- κ B) (Lagadec, 1999).

Por otra parte, se cree que la sobreproducción de TGF- β en animales transgenicos contribuye a la patogenia de la EA, por favorecer la producción de la proteína β A y la formación de depósitos. (Masliah, 2001; Wyss-Coray, 2000; Wyss-Coray, 1997), así de manera contradictoria a sus propiedades anti-inflamatorias se sugiere que el TGF- β es de riesgo para el desarrollo de EA (Mattson y col., 1997).

Uno de los mecanismos por lo cuales TGF- β podría acelerar la formación de depósitos de amiloide en EA es por un aumento en la expresión neuronal y glial de la presenilina 1 (PS-1) e indirectamente modulando el procesamiento de β APP (Tabla 2) (Masliah y col., 2001)

En contraste, se reporta que TGF- β protege a las neuronas hipocampales de rata de la degeneración inducida por el fragmento de 25-35 aa de β A (β A₂₅₋₃₅) *In vitro* (Ren y Flanders, 1996; Ren y col., 1997). Además, los niveles del mRNA para el TGF- β en la corteza cerebral están correlacionados positivamente con el grado de depósitos amiloides cerebrovasculares (Wyss-Coray y col., 1997).

Tabla 1

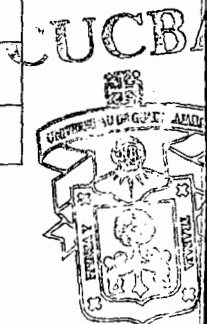
Vías a través de las cuales TGF-β puede jugar un papel en EA
Regula la respuesta de astrocitos
Activa las células microgliales
Aumenta la producción de matriz extracelular
Acumula y re-distribuye la proteína β A en los vasos
Regula la muerte celular programada

(Masliah y col., 2001)

Tabla 2

Vías a través de las cuales TGF-β puede regular la producción y deposición de la proteína βA
Incrementa la síntesis de β APP
Eleva la vida media del mRNA para β APP
Aumenta la producción de Apo E
Promueve la acumulación y distribución de β A en la microvasculatura
Favorece la expresión de PS-1

(Masliah y col., 2001)



BIBLIOTECA CE

Respuesta de interleucinas pro-inflamatorias al β -amiloide en función de tiempo

En trabajos previos realizados en el laboratorio de Desarrollo/Envejecimiento del Centro de Investigación Biomédica de Occidente; se encontró que el β -Amiloide fibrilar, aplicado directamente, *in situ*, sobre la región CA1 del hipocampo produce estrés oxidativo y que efectivamente, el fragmento peptídico de 1-42 aminoácidos se relaciona con un incremento en los niveles de interleucinas pro inflamatorias (artículo enviado a publicación).

En los resultados de dichos trabajos, se encontró un incremento en la actividad de las citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6 ante la presencia del β Af administrado *in situ* directamente en el hipocampo. Con los resultados obtenidos se realizó una curva cinética de β A intracerebral contra interleucinas y nitritos, en función de tiempo, en donde se observaron relaciones paralelas entre citocinas y nitritos, indicando probables mecanismos autoregulatorios entre las mismas (Figura 1 y 2).

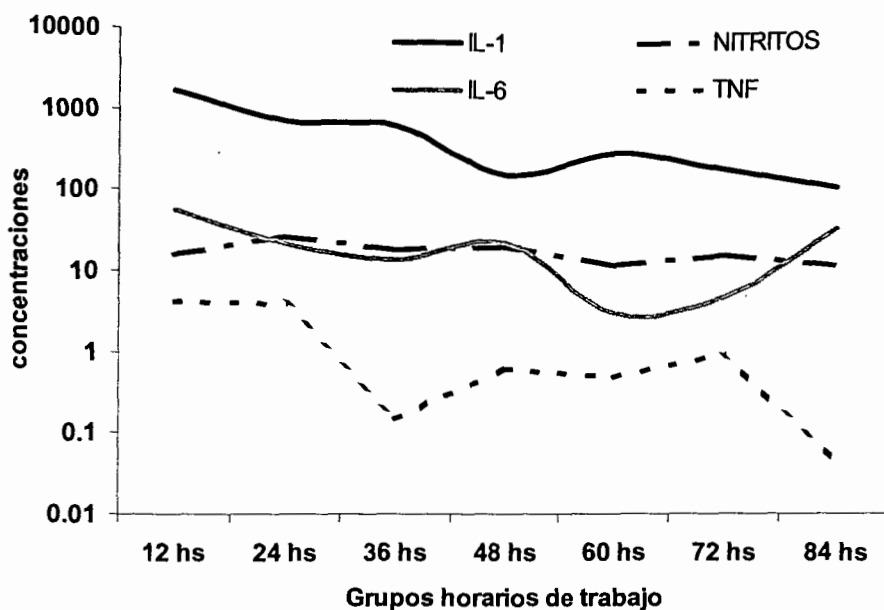


Figura 1.- Relación entre las oscilaciones de nitritos inducidas por la proteína βA y los niveles de interleucinas proinflamatorias en números logarítmicos. En la gráfica se observan los animales que recibieron βAf ; primero ocurren los incrementos en las concentraciones de interleucinas, además de que hay una disociación con los nitritos alrededor de las 48 horas. Las concentraciones de nitritos son en μg por mg de proteína. Las concentraciones de interleucinas son en pg/mg de proteína en cada muestra. La razón de mostrarlas juntas, aun cuando correspondan a diferentes concentraciones es para patentizar la estrecha sincronía entre las oscilaciones de las distintas variables estudiadas. (Rosales S, 2003)

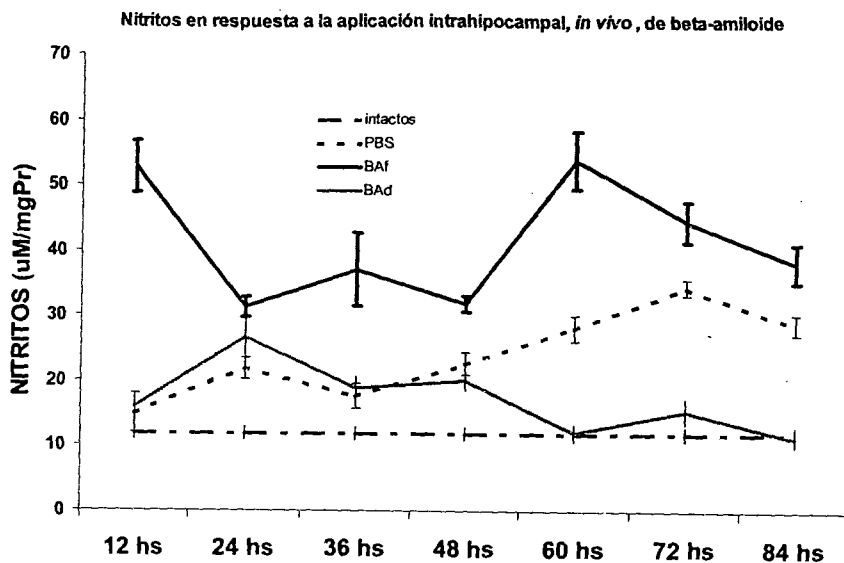


Figura 2. La gráfica muestra la relación inversa entre el efecto inducido por el β Af (línea negra continua) sobre los niveles de nitritos, en comparación con el efecto logrado con la inyección del péptido semejante al β A (β Ad, línea gris continua). La comparación del β Af con el β Ad, parecen una imagen en espejo. (Rosales S, 2003)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estudios previos *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el β A induce una respuesta de citocinas proinflamatorias y anti-inflamatorias.

Se han reportado post-mortem niveles elevados de TGF- β en pacientes con EA, así como un incremento de patogenicidad de EA en animales transgénicos con sobreproducción de TGF- β , aunque en un estudio *in vitro* no se detectó ni TGF- β , ni IL-10 bajo la inducción de β_{A25-35} , no se ha demostrado niveles elevados de IL-10 en pacientes con EA, pero sí en ratones transgénicos e incluso *in vitro* IL-10 protege contra la toxicidad de la proteína β A.

Sin embargo, no se han hecho estudios *in vivo*, mediante la aplicación directa del β A, que demuestren, en función de tiempo, si el β -amiloide induce la expresión de interleucinas anti-inflamatorias como TGF- β e IL-10.

HIPÓTESIS

La inyección *in vivo* de la proteína β -Amiloide fibrilar sobre la región CA1 del hipocampo de ratas, incrementa la producción de TGF- β e IL-10 como efecto compensatorio.

OBJETIVOS

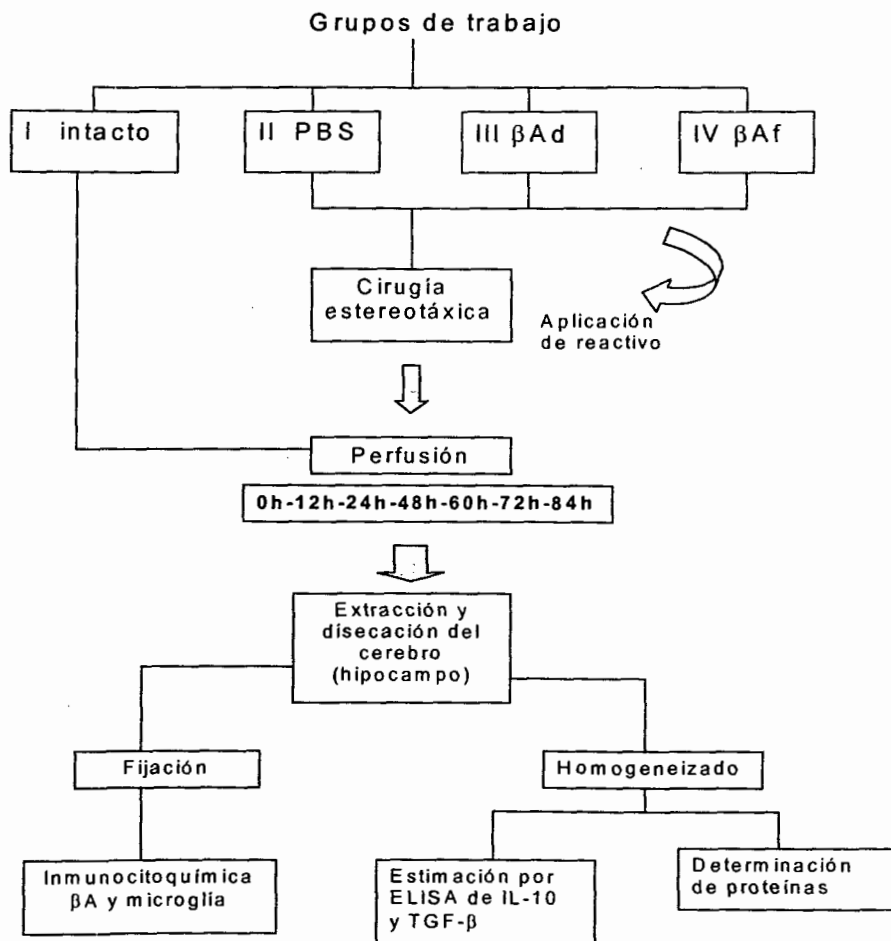
Objetivo general

Evaluar, en función de tiempo, la respuesta de la IL-10 y el TGF- β a la inyección de β -amiloide fibrilar *in vivo* sobre la región CA1 del hipocampo, en el cerebro de rata.

Objetivos Específicos.

1. Demostrar que el β Af y la microglía activa se encuentran presentes sobre la región CA1 del hipocampo.
2. Cuantificar los niveles de IL-10 y de TGF- β en el tejido homogeneizado de la región CA1 del hipocampo bajo el efecto del β -amiloide fibrilar y β -amiloide desordenado inyectado *in vivo*.
3. Establecer una relación cinética de los niveles de interleucinas anti-inflamatorias en función de tiempo.

METODOLOGÍA



Diseño experimental

Se trabajo con ratas de la cepa Wistar, machos, adultos, con un peso entre 280 y 300 g. Las variables a determinar fueron IL-10, TGF- β (dependientes) β Af y tiempo (independientes). Las hembras fueron excluidas, por el sesgo que representarían los estrógenos, debido a su reconocido papel protector en el estrés oxidativo. Se eliminaron del estudio animales enfermos, con infecciones intercurrentes sistémicas o en el sitio de la aplicación de la cánula, o con hemorragia cerebral por la manipulación quirúrgica. Los animales fueron alimentados *ad libitum* con alimento balanceado para roedores de laboratorio (Nutri-Cubos Ralston Rations: Manna pro Corporation Kansas U.S.A.), y mantenidos en ciclos de luz / oscuridad 12 x 12. Fueron divididos en cuatro grupos: Grupo 0..... **INTACTOS**; grupo Tampón **FOSFATO SALINO (PBS)** (animales a los que se les colocó la cánula y se les inyectó PBS sobre la región CA1 del hipocampo izquierdo); grupo **β -AMILOIDE DESORDENADO** (animales a los que se les colocó la cánula, dirigida hasta la región CA1 del hipocampo, y a través de ella se les inyectó β Ad, en la región CA1 del hipocampo izquierdo) y grupo **β -AMILOIDE FIBRILAR** (animales a los que se les colocó la cánula y fueron inyectados con β Af sobre la región CA1 del hipocampo izquierdo).

A su vez, los grupos 1, 2 y 3 fueron divididos en subgrupos horarios conforme al tiempo transcurrido entre la aplicación del PBS, β Ad o del β Af y la obtención del tejido para su estudio. Así, quedaron 6 subgrupos: 12 h, 24 h, 48 h, 60 h, 72 h y

84 h. La decisión de obtener los tejidos de esta manera se basa en una curva cinética realizada en nuestro laboratorio, donde se observaron los cambios en las concentraciones de citocinas en función de tiempo después de aplicar PBS, β Ad o β Af en CA1.

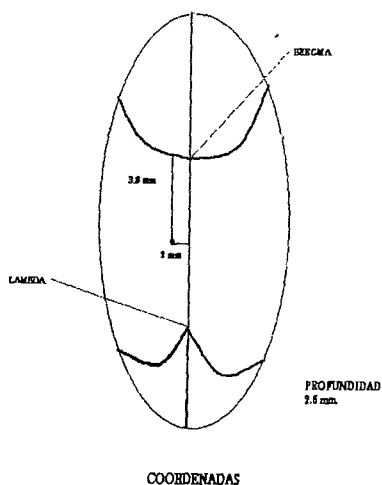
Colocación de cánulas

Bajo anestesia general por Pentobarbital (40 mg/kg de peso corporal), y bajo condiciones de asepsia se procedió a colocar una cánula de acero inoxidable directamente sobre la región CA1 del hipocampo.

Se utilizaron agujas hipodérmicas calibre 30G (Septodont Sherwood Medical Company St. Louis U.S.A.), adaptadas a una longitud

de 2.6 mm, estériles, las cuales fueron colocadas en su sitio mediante cirugía estereotáxica. Para efectuar lo anterior, se siguieron las coordenadas de Paxinos y Watson (1992), se tomó como referencia el bregma (Figura 3), 3.8 mm en sentido anteroposterior, 2 mm a la izquierda de la línea media y a 2.6 mm en sentido dorso-ventral. De este modo la punta de la cánula quedó sobre la región CA1 del hipocampo.

Figura 3



Se procedió a aplicar el PBS o el β A, según fue el caso, en un volumen de 5 μ l y durante un lapso de 15 min, empleando para ello una bomba peristáltica de microinyección (Perplex Lkb producter Hamilton Co. Reno Nev U.S.A.).

Preparación del β -Amiloide fibrilar

Se obtuvo el fragmento completo de 1-40 aminoácidos (Sigma, A-1075, liofilizado), con un peso molecular de 4329.8 Da, el cual primero solubilizado y luego agregado en fibrillas insolubles para su posterior aplicación intra-hipocampal. Se siguió la metodología descrita por Weldon y cols., 1998, que consiste primero en disolver el liofilizado en una solución amortiguadora salina de fosfatos (PBS) a pH de 7.5 a concentración 10⁻⁴M. El β A así disuelto se mantiene en agitación orbital continua durante 36 horas, a temperatura ambiente. Terminado ese periodo de tiempo, la solución se vuelve turbia y es el momento de someterla a ultracentrifugación (15 000 xg durante 10 minutos). Se forma así una pastilla en el fondo del tubo de centrifugación, que no es sino el β A que se ha tornado fibrilar y se acumuló en agregados de hojas β -plegadas. Se deshecha el sobrenadante y el β Af se resuspende en PBS estéril, que sirvió como vehículo, a un pH fisiológico. El volumen para resuspender fue de solo 125 microlitros, lo cual nos dio una concentración de casi 1 M (0.92 M). Se dispensan en alícuotas de 100 μ l por vial y se mantienen protegidas de la luz a -20°C, hasta su empleo.

Preparación del β -Amiloide desordenado

Es un péptido sintético (Sigma, A-2326) con el mismo peso molecular que el β Af de 1-40 aa pero en distinto orden. Viene en presentación liofilizado y se resuspendió con PBS estéril a pH fisiológico.

Una vez aplicado el β Af, β Ad ó el PBS y después de los intervalos de tiempo señalados los animales fueron sacrificados. Para esto, los animales fueron anestesiados con éter y luego perfundidos con PBS 0.1M, para obtener la porción de tejido cerebral circundante a la zona donde se aplicó el reactivo.

Para comprobar la presencia del β Af en el sitio de inyección se tomo una muestra de tres animales, los cuales recibieron el mismo tratamiento con β Af que los del grupo 2, y fueron sacrificados para la obtención del tejido y cortes histológicos teñidos por inmunocitoquímica para β A.

La preparación de los tejidos para inmunocitoquímica Anti- β A e I β 4

Colocación de la cánula y aplicación del β Af (acorde a lo descrito líneas arriba); perfusión del animal con PBS 0.1 M, seguida de perfusión con paraformaldehído al 4% de 300 ml aproximadamente; obtención del cerebro completo y post-fijación con paraformaldehído por 24 horas más; inclusión en parafina; obtención de cortes de 10 micras de espesor; montaje en laminillas recubiertas con gelatina y alumbre de cromo/potasio y procesamiento para inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo primario y un secundario.

Anti- β A

Desparafinado [15 min. en Xilol 2 pases, 5 min. en alcohol absoluto, 5 min. en alcohol al 90 %, 5 min. en alcohol al 80 % y lavado con agua destilada]; lavado con tritón-albúmina en PBS (PTA; *Triton x-100 2 ml (Sigma, T-9284), albúmina 1 g (Sigma, A-3059), PBS (NaCl 8 g (Baker, 3624), KCl 0.2 g (Baker, 3818), Na_2HPO_4 0.6 g (Productos Qcos Monterrey, 2484) y KH_2PO_4 0.2 g (Baker, 3246) cbp 1000 ml a pH de 7.3); desenmascaramiento de epítopes incubación por 10 min. [Tripsina 0.1% (Sigma, T 2271), ácido etilendiamino tetraácetico sal di sódica 0.2 g (EDTA, Sigma 5693) y 100 ml de PBS a pH de 7.3]; bloqueo de peroxidasas 15 min. [Metanol 5 ml (Productos Qcos Monterrey, 0612), peróxido de hidrógeno 1.5 ml (Baker, 2186) y PBS 0.1 M 43.5 ml]; bloqueo de uniones inespecíficas con buffer de glicina/lisina en suero del animal donde se obtuvo el anticuerpo secundario marcado (cabra) incubación hora y media [Glicina 0.30 g (Sigma, G-7126), lisina 0.73 g (Sigma, L-5626), suero de cabra 1 ml (Sigma, G-P023) y PTA 19 ml]; incubación con el anticuerpo primario policlonal (Anti β A hecho en conejo Sigma, A-8326) por toda la noche. El anticuerpo viene liofilizado y se disuelve en 1 ml de buffer conteniendo tritón al 0.1% en Tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto (TRIS-Hcl Sigma, T-1503) 0.1 M más suero de cabra al 5%. Así, se obtiene una solución de almacenamiento con 100 μ g/ml. A partir de ahí, se obtienen alicuotas de 10 a 20 μ l la solución de trabajo. Se coloca el anticuerpo sobre las laminillas y éstas se colocan en una cámara húmeda que se deja en el refrigerador durante toda la noche, a 4°C. Para evitar el derramamiento del líquido con el anticuerpo, se le coloca encima una tira de parafilm. Incubación con el



anticuerpo secundario (Anti-rabbit IgG; Sigma, A-9044; marcado con peroxidasa) incubación por una hora (*cada paso esta precedido por tres lavados de 3 min. con PTA); revelado con diaminobenzidina (DAB; Sigma, D-5905), (Solución A: DAB al 0.3% 30 mg en TRIS-HCl 0.1 M 100 ml y solución B H₂O₂ al 30% 1.5 ml en TRIS-HCl 0.1 M 50 ml) las soluciones se preparan hasta el momento de ser empleadas disolviendo 40 ml de la solución A en 200 µl de las solución B y se incuba por 25 min.) y contratinción (Hematoxilina 5 min., H₂Obd corriente, alcohol ácido, agua corriente, agua amoniacal, agua corriente, alcohol al 96%, eosina 1 a 2 min., alcohol al 100% 2 min. repetir por tres ocasiones, escurrir, Xilol, colocación del cubreobjetos sobre una gota de resina).

Ib4

Desparafinado; lavado con PTA; desmascaramiento con tripsina-EDTA 10 min.; lavado con PTA; bloqueo de peroxidasa 15 min.; lavado con PTA; preincubar con cationes 10 min. [Cl₂ Ca 0.1 mM (Prod Qcos Monterrey, 2429), Cl₂ Mg 0.1 mM (Prod Qcos Monterrey, 2462) , Cl₂ Mn 0.1 mM (Sigma, 3634) y PBS 0.1 mM c.b.p. 50 ml]; 2 lavados con PTA; incubar con isolectina b4 (Sigma, L-5391) 10 mg/ml a 4°C toda la noche, se diluye en PTA/Tween al 0.1 %; 2 lavados con PTA; se incuba con el complejo avidina-biotina (Vector Labs PK-6102) por 2 h; lavado con PTA; revelado con DAB y contrateñido con hematoxilina/eosina.

Preparación de los tejidos para estudio de factores solubles:

Homogeneizado

Para homogeneizar los tejidos primero se obtuvo el tejido con la ayuda de un sacabocados. Se tuvo así una pieza de forma cilíndrica, de aproximadamente 180 mg del tejido, circundante a la cánula donde se hubo instalado el β Af. Dicho tejido fue homogeneizado empleando un tampón con inhibidores de proteasa [Ácido n-morfolino-etanosulfónico 100 mM pH 6.7 (MES; Sigma, M-5287), ácido tetra etileno-glicólico 1 mM (EGTA; Sigma, E-0396), fenil-metil-sulfonil fluoruro 1 mM (PMSF; Sigma, P-7626), Aprotinina 0.3 M (Sigma, A-6279), Leupeptina 1 μ M (Sigma, L-2884) y Pepstatina 1 μ M (Sigma, P-5318)] con un homogenizador ultrasónico (Virsonic 100: The virtis company INC Gardiner N.Y. U.S.A.).

Una vez formado el homogenado se centrifugo a 10,000 xg durante 10 minutos para obtener un sobrenadante rico en proteínas solubles.

Determinación de proteínas

Se obtuvo un valor de referencia en todas las determinaciones para cada homogeneizado de tejido. Se empleo el método de Bradford (Bradford y col., 1976). Soluciones: se disolvieron 100 mg de azul Comassie (Sigma, G-250) en 50 ml de etanol al 90% más 100 ml de ácido fosfórico al 85% (peso/volumen) y se aforó la solución a un volumen total de 200 ml con agua bidestilada. Esta solución de trabajo se almacenó a 5°C y se diluyó en cuatro volúmenes de agua destilada antes de ser usada. La solución estándar de proteínas con albúmina sérica bovina

se preparo a la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ y sirvió para construir una curva estándar. Se diluyo la solución estandar de proteínas en volúmenes de 100 μl con PBS 0.1M, se adicionaron 5 ml de reactivo a cada fracción y se midió la densidad óptica a 595 nm. y se utilizaron 5 ml del reactivo de Bradford en 100 μl de PBS como blanco.

Determinación de interleucinas por ELISA

Las dosificaciones inmunoenzimáticas en fase heterogénea fueron descritas para la dosificación de antígenos y rápidamente se aplicaron para la dosificación de anticuerpos. El nombre ELISA (Enzima-linked-immunoadsorbent-assay) se emplea actualmente para todas las dosificaciones que utilizan enzimas marcadoras. Los procedimientos se basan en los mismo esquemas de reacción que los de los métodos radioinmunológicos.

En la determinación de tipo competitivo o de tipo "sándwich" empleada en este protocolo, el antígeno que se dosificó fue captado en un primer tiempo por el anticuerpo específico inmovilizado sobre un soporte, (placas de 96 pocillos de poliestireno para este trabajo). La cantidad de antígeno que ha formado un complejo se mide, en un segundo tiempo, después de su reacción con un anticuerpo de la misma especificidad acoplado a una enzima. Para esta determinación es necesario que el antígeno tenga varios epitopes (idénticos o no), de manera que después de su reacción con el anticuerpo inmovilizado pueda reaccionar todavía con el segundo anticuerpo específico acoplado a una enzima.


Por tanto, la actividad enzimática obtenida es proporcional a la cantidad de antígeno fijada por el primer anticuerpo.

Las pruebas se hicieron con el empleo de kits prefabricados para este propósito, (R&D SYSTEMS IL-10 rat kit ELISA (y TGF- β human kit ELISA test).

Las pruebas estadísticas se hicieron con una ANOVA de 2 vías.

RESULTADOS

Las fotomicrografías presentadas en el presente trabajo son un estudio que pretende demostrar la presencia del β -amiloide después de 21 días de su aplicación, esto en la zona de su aplicación, las zonas circunvecinas y propiamente en la región CA1 del hipocampo (Fig. 5 y 6). Los cortes conservan su arquitectura y fueron teñidos con Hematoxilina / eosina (Weldon y col., 1998).

El tamaño real representado de cada fotomicrografía es de 100 μ M 

Los agregados de β Af se asocian con la degeneración neuronal y la activación de la microglía (Fig. 7 y 8), estas figuras sirvieron de apoyo para demostrar la posible actividad pro-inflamatoria de la microglía como evento dominante; ya que los depósitos de β Af ejercen un estímulo constante sobre las células microgliales y por si solos pueden ser suficientes para inducir una liberación crónica de citocinas pro-inflamatorias. Las inmunocitoquímicas controles para β A y microglía no son presentadas debido a que no se detectaron.

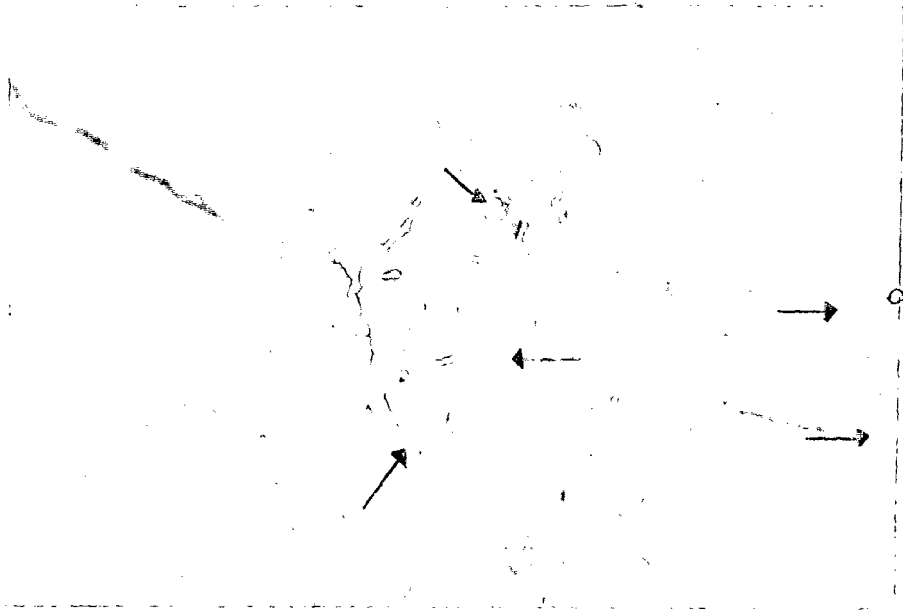


Figura 4.- Zona de aplicación del β -amiloide teñido con técnica de inmunocitoquímica empleando anticuerpos monoclonales contra β -amiloide. Se observan los depósitos amiloide (\rightarrow), en corteza e hipocampo, contrateñidos con hematoxilina y Eosina. 100 μ M

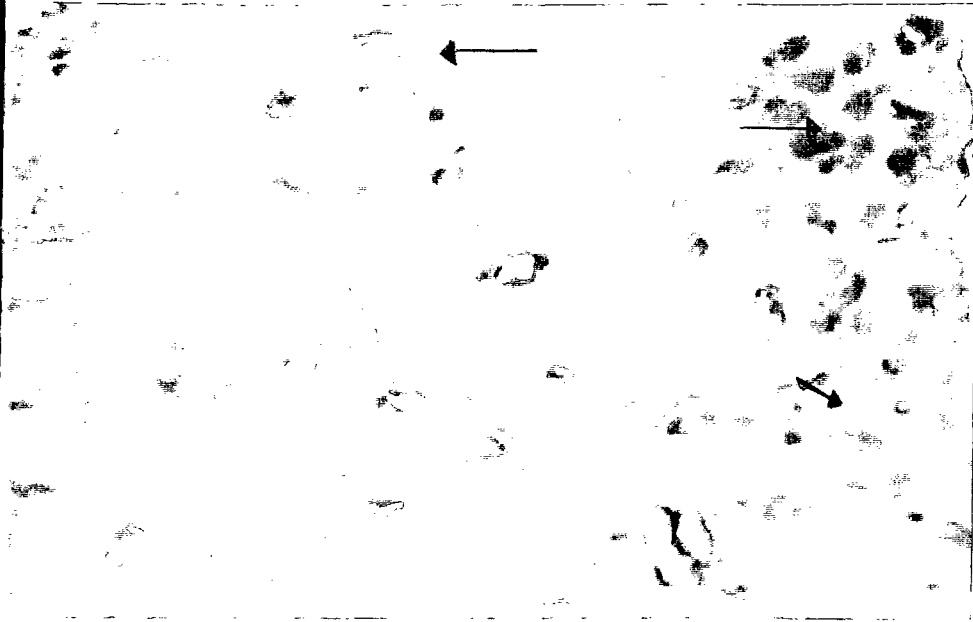


Figura 5.- Depósitos de amiloide en la corteza cerebral vecina al hipocampo.

Técnica de inmunocitoquímica empleando anticuerpos

monoclonales contra β -amiloide. 100 μ M

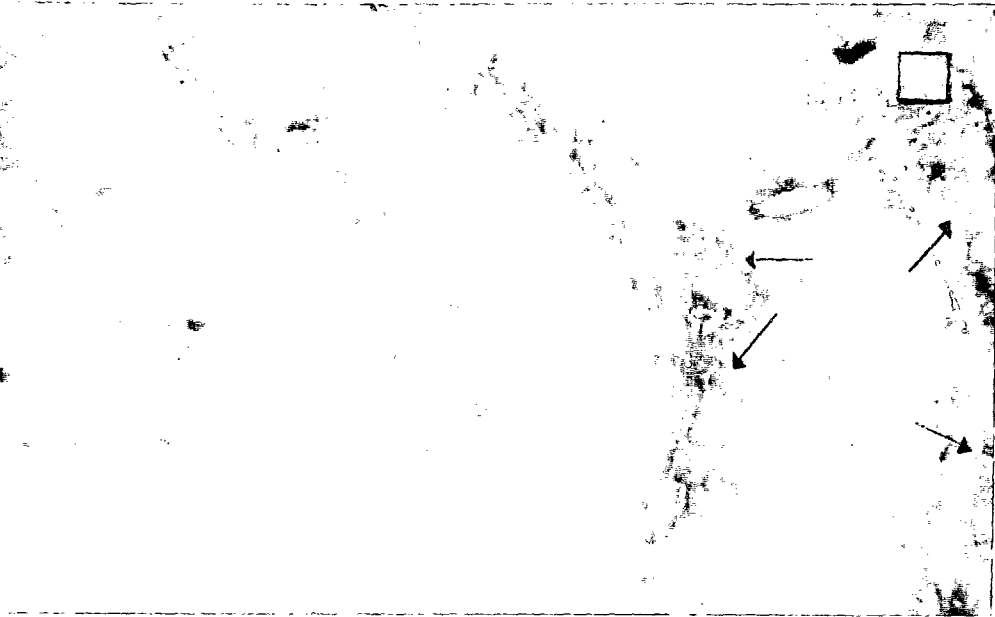


Figura 6.- Zona de aplicación del β -amiloide sobre la región CA1 del hipocampo, donde se aprecia las células microgliales teñidas por inmunocitoquímica con anticuerpos anti-selectina b4. Revelado con Hematoxilina -Eosina y Zinc. Se observan los aglomerados de microglia en torno a ese sitio (\rightarrow). Se aprecian también las zonas delimitantes del hipocampo. El recuadro señala la zona ampliada que se muestra en la siguiente fotomicrografía. 100 μ M

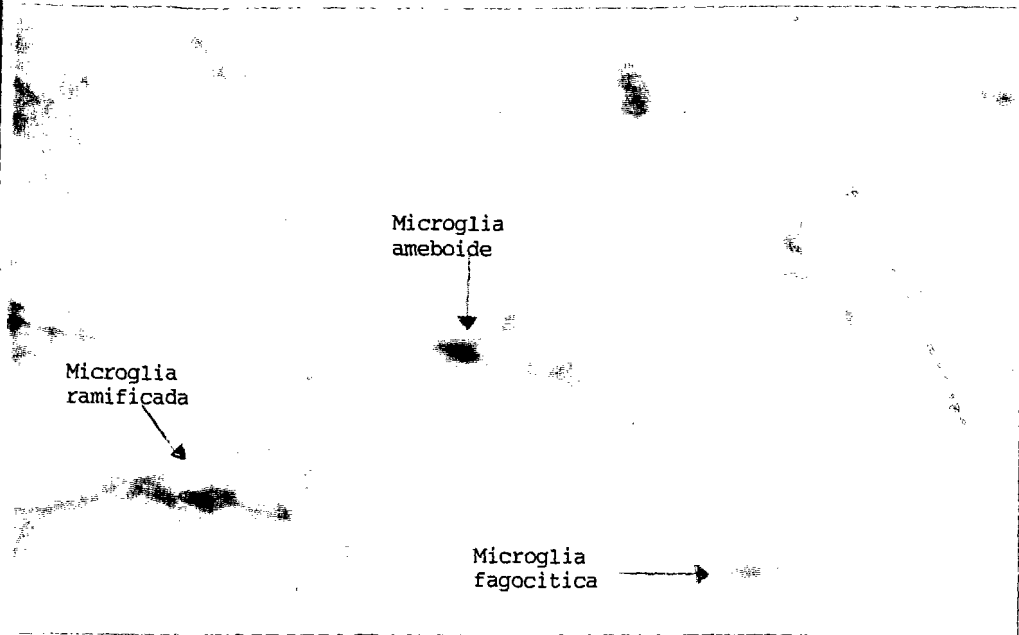


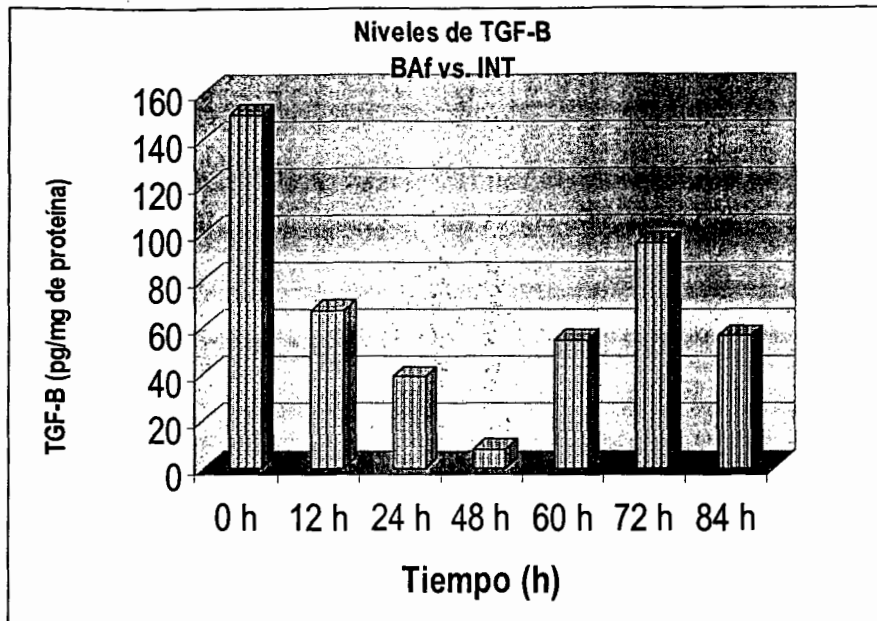
Figura 7.- Células microgliales teñidas con anticuerpos anti-isolectina b4 marcada con peroxidasa y revelada con diaminobenzidina. El área corresponde a la zona del recuadro, arriba. 100 μ M

La inyección intrahipocampal de la proteína β -amiloide administrado *in situ* directamente en el hipocampo se relacionó con niveles bajos de TGF- β en comparación con el grupo de animales testigo. Durante los primeras 12 y 24 h después de inyectado el β Af los niveles de TGF- β disminuyeron significativamente y así se mantuvieron hasta las 48 h cuando las concentraciones de TGF- β alcanzaron niveles de casi cero.

A partir de las 60 h los niveles de TGF- β se elevan, no rebasando los 60 pg/mg de proteína que corresponde a un 36% con respecto al grupo de animales intactos ($p < 0.05$) (Gráfica 1). A las 72 h los niveles de TGF- β alcanzan una concentración de 95.5 pg/mg de proteína siendo esto un 63% con referencia al nivel basal y a las 84 h vuelve a tener un descenso de 56 pg/mg de proteína ($p < 0.05$).

Los valores observados en el grupo de animales intactos se toman como los niveles basales para efectos de todas las comparaciones y corresponden al 100% ó a las cero horas.



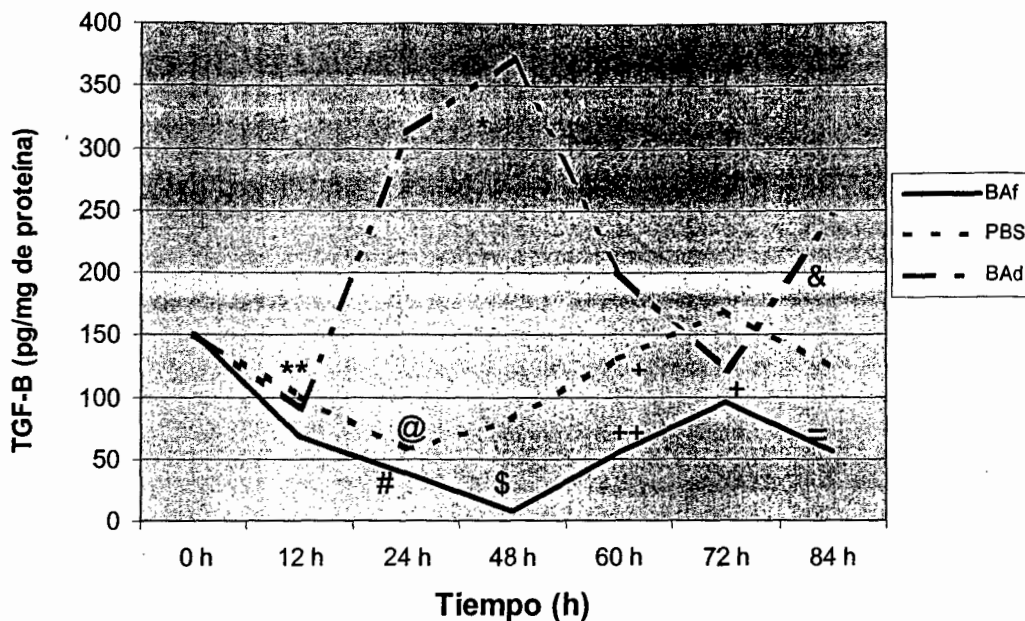


Intacto. Animales a los que no se les hizo ninguna manipulación

β Af. Animales a los que se les administró el β amiloide fibrilar

Gráfica 1. El β Af reduce de manera significativa las concentraciones de TGF- β con referencia al grupo intacto, a las 48 horas se observa un descenso drástico. Las 0 h corresponden al grupo de animales intactos.

En el primer intervalo de tiempo no se presentaron diferencias significativas entre los tres grupos de estudio BAF, PBS y BAd, todos disminuyeron por debajo de los niveles basales con referencia al grupo de animales intactos ($p < 0.001$); entre los grupos de BAF y PBS no hubo diferencias significativas en el segundo intervalo de tiempo 24 h, en tanto que el grupo de animales inyectados con BAd elevó sus concentraciones de TGF- β muy por encima del grupo de animales intactos ($p < 0.0001$) y se presentaron diferencias significativas entre el grupo de animales inyectados con PBS ($p < 0.01$) y BAF ($p < 0.006$) con referencia al grupo BAd; a las 48 horas la reducción en las concentraciones de TGF- β en nuestro grupo de interés BAF fue drástica ($p < 0.0005$) en comparación del grupo intacto, PBS se mantuvo por debajo de los niveles basales y presentó una diferencia significativa ($p < 0.04$) en comparación del grupo de animales inyectados con BAF, BAd alcanzó su pico máximo, observando diferencias muy significativas entre los tres grupos ($p < 0.0001$); a las 60 hrs. continúa existiendo una diferencia significativa ($p < 0.03$) entre los grupos de BAF y PBS y entre el grupo BAF y BAd ($p < 0.002$); entre las 72 ($p < 0.003$) y 84 h ($p < 0.001$) el grupo de BAF presenta diferencias significativas con referencias al grupo intacto y con referencia al grupo PBS a las 84 h ($p < 0.05$). A las 60, 72 y 84 horas no hubo diferencias significativas entre los grupos de animales inyectados con PBS y los grupos intactos. BAd desciende a las 72 h ($p < 0.02$) alcanzando los mismos niveles que los animales intactos y a partir de las 84 h vuelve a elevarse por encima de los controles presentando diferencias significativas con respecto al grupo de animales inyectados con BAF ($p < 0.04$) (Gráfica 2).



PBS. Animales a los que se les aplicó tampón fosfato salino.

βAf. Animales a los que se les administró el β-amiloide fibrilar.

βAd. Animales a los que se les aplicó el β-amiloide desordenado.

Gráfica 2. La inyección intrahipocampal de la proteína β-amiloide reduce de manera significativa los niveles de el TGF-β en un primer tiempo y en un segundo tiempo después de las 48 horas; por el contrario a lo que se esperaba, el BAd incrementa los niveles de TGF-β. El grupo BAF y PBS presentan un comportamiento similar en todos los grupos horarios. ** $p < 0.001$ BAF, BAd, PBS vs. Intacto # $p < 0.006$ BAF vs. BAd @ $p < 0.01$ PBS vs. BAd * $p < 0.0001$ BAd vs. Intacto \$ $p < 0.04$ BAF vs. PBS + $p < 0.03$ BAF vs. PBS ++ $p < 0.002$ BAF vs. BAd = $p < 0.05$ BAF vs. PBS & $p < 0.04$ BAd vs. BAF

A las 12 horas de aplicado el βAf, el PBS o incluso el βAd, los niveles de TGF-β disminuyeron en un 64% en relación con el grupo de animales intactos considerados

como el nivel basal, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos de estudio señalados ($p > .001$) (ANOVA).

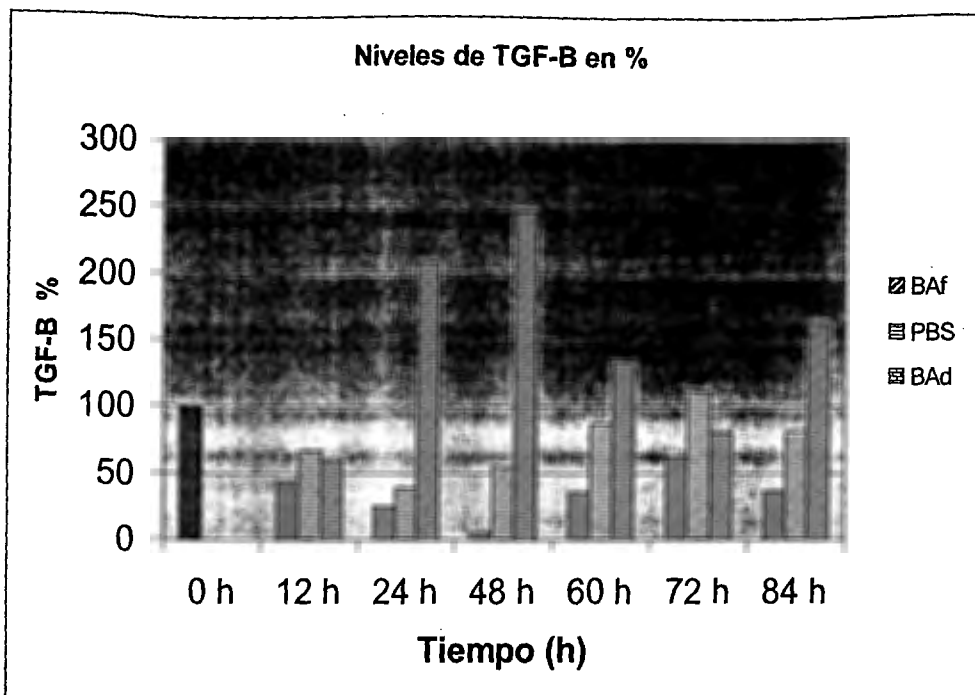
A las 24 hrs. el TGF- β en el grupo de animales inyectados con BAf y PBS descienden (75% y un 61% respectivamente) quedando en un 25% el grupo de animales con BAf ($p < 0.006$) y en un 39% el grupo de animales con PBS ($p < 0.01$) con referencia al grupo intacto, presentando diferencias significativas comparados con el grupo de animales inyectados con BAd que se eleva en un 208% por encima del nivel basal ($p > 0.0001$).

A las 48 horas los tres grupos de estudio; BAf, PBS y BAd presentan diferencias significativas ($p > 0.0001$); el grupo de animales inyectados con PBS se eleva un 15% alcanzando un 54% con referencia al nivel basal, en tanto que en los animales inyectados con BAf la concentración de TGF- β desciende en un 95% llegando a una concentración cercana al cero ($p < 0.0005$). Por su parte en los animales inyectados con la forma parecida al βA (BAd), se alcanzó un pico máximo de 400 pg/mg de proteína (247% más que el grupo intacto) ($p < 0.0001$).

A las 60 horas la actividad del TGF- β observada en el grupo BAd desciende acercándose a los niveles basales (134%). El grupo de animales inyectados con PBS alcanza casi los mismos niveles que los animales intactos (87%) y el grupo de animales inyectados con BAf se eleva en un 31% con referencia a las concentraciones cero.

A las 72 horas las concentraciones de TGF- β en el grupo de animales inyectados con BAd, que habían experimentado una alza inesperada, retoman a los niveles basales (80%) ($p < 0.02$). En el grupo de animales inyectados con BAf los niveles tienden a elevarse pero en general no sobrepasan los 55 pg/mg de proteína; esto es 37 % por debajo de los basales ($p < 0.003$). Las concentraciones del grupo inyectado con PBS alcanza su pico máximo alcanzando las mismas concentraciones que los animales.

A las 84 horas parece que los tres grupos BAf, PBS y BAd presentan un comportamiento muy similar que al inicio de la manipulación; el grupo de animales inyectados con BAd se vuelve a incrementar en un 163% y los grupos BAf y PBS decaen en un 63% y en un 18% respectivamente con referencia a los animales intactos (Gráfica 3).



Intacto. Animales a los que no se les hizo ninguna manipulación
 PBS. Animales a los que se les aplicó tampón fosfato salino.
 β Af. Animales a los que se les administró el β -amiloide fibrilar.
 β Ad. Animales a los que se les aplicó el β -amiloide desordenado

Gráfica 3. La aplicación de BAF y PBS reducen de manera significativa los niveles de TGF- β con referencia al valor basal del grupo de animales intactos (hora cero), en cambio los animales inyectados con BAd muestran elevadas concentraciones de TGF- β a las 24,48,60 y 84 hrs.

DISCUSION

En el presente trabajo se examinó el efecto de la proteína β A fibrilar y desordenado administrado *in situ* directamente en el hipocampo sobre la producción de citocinas TGF- β e IL-10 *in vivo* en un modelo con ratas Wistar, machos, adultos con un peso entre 280 y 300 g. TGF- β e IL-10 son citocinas anti-inflamatorias producidas por microglía y astrocitos que modulan a su vez la biosíntesis de citocinas pro-inflamatorias (Mizuno y col., 1994; Hopkins y col., 1995).

En pacientes con EA avanzada se han reportado niveles elevados de TGF- β en cerebro, LCR y suero (Dinarello 2000; Wyss-Coray 2000; Amara y col., 1999; Chao y col., 1994a,b) y ha sido detectada la expresión de TGF- β en una proporción de placas seniles (Van der Wal y col., 1993, Flanders y col., 1995).

En nuestro trabajo, se encontró una marcada disminución de niveles tisulares de TGF- β después de 12-84 h de la inyección intrahipocampal de la proteína β -amiloide; contrariamente a lo que se esperaba.

En los resultados se pretendía encontrar los niveles titulares de TGF- β muy por encima de las concentraciones basales esto debido al efecto compensatorio anti-inflamatorio que se desarrollaría en el transcurso de los intervalos de tiempo.

Con la técnica empleada o tal vez debido al corto tiempo de estudio no fue posible determinar si la reducción en los niveles de TGF- β se debe a la inyección intrahipocampal del β A *per-se* o simplemente es un reflejo de actividad pro-inflamatoria pre-dominante de las células microgliales.

En este modelo de estudio por el método de ELISA no se detectó IL-10 en los homogeneizados del tejido hipocampal, lo que coincide con los datos que mencionan la ausencia de la expresión de IL-10 en cerebros de pacientes con EA (Eikelenboom y col., 1994; Flanders y col., 1995). Nuestro trabajo concuerda también con los de Meda que no logró detectar IL-10 con la aplicación del β A(25-35) en cultivos de monocitos humanos y microglía murina (Meda y col., 1998). Sin embargo, IL-10 se ha detectado en estudios *in vitro* con cultivos de monocitos retados con LPS e IFN γ (Williams y col., 1996), así como por la aplicación combinada de β A(1-42) y LPS (Szczepanik y col., 2001). En animales transgénicos que tienen sobreproducción de β A se han reportado datos contradictorios; Apelt en ratones transgénicos Tg 2576 reportó la presencia de IL-10 (Apelt y col., 2001), en cambio Mehlhorn en ratones transgénicos de la misma cepa no ha encontrado IL-10 (Mehlhorn y col., 2000).

La aplicación del β A elevó de manera significativa los niveles de TGF- β en las 24, 48, 60 y 84 h, lo cual posiblemente se debe a una menor actividad pro-oxidante que se demostró en el trabajo que antecede a esta tesis donde se evaluaron en función de tiempo las interleucinas pro y anti-inflamatorias,

relacionadas a su vez con indicadores de estrés oxidativo, encontramos que el BAd redujo de manera significativa las concentraciones de nitritos comparada con PBS y BAf. Como se observa en la figura 2, la relación de patrones gráficos correspondientes a BAf y a BAd parece a una imagen en espejo. Lo anterior, aunado al efecto inductor de TGF- β observado en este trabajo, más ciertos antecedentes que refieren efectos neuroprotectores del β A en su forma soluble (Soto y col., 1994) e incluso a β -APP que tiene funciones de cito-protección durante el desarrollo (Clarris y col., 1995; Mattson 1997), nos induce a considerar que el BAd pudiera manifestar efectos neuroprotectores.

En el presente trabajo se encontró que el β -amiloide fibrilar permanece en el cerebro hasta 21 días después de haber sido aplicado y es detectable por la tinción con rojo Congo (Weldon y col., 1998), así como una actividad microglial predominante en el área donde se inyectó el β Af, principal responsable de la producción de citocinas (Ishii y col., 2000; Mehlhorn y col., 2000; Benveniste y col., 2001). Esto respalda la actividad pro-inflamatoria en la zona de aplicación del β A que bien podría ser la responsable de la inhibición en la producción del TGF- β .

Los trabajos que relacionan la EA con las citocinas pro- y anti-inflamatorias han ido en aumento en los últimos años (Apelt y col., 2001; Benveniste 1998; Dinarello 2000; McGeer y col., 1996; Mehlhorn y col., 2000), hecho que nos hace suponer el importante papel que juegan estos factores en el proceso de neurodegeneración.

Es importante indagar en la expresión de los mRNA de ambas citocinas anti-inflamatorias TGF- β e IL-10, así como de los efectos protectores que estas tendrían en base a una administración sistémica a dosis farmacológicas.

CONCLUSIONES

- Presencia de β Af y actividad microglial en la zona de su aplicación, las zonas circunvecinas y propiamente en la región CA1 del hipocampo.
- Los niveles de TGF-beta disminuyen notablemente ante la inyección intrahipocampal de la proteína β -amiloide fibrilar en un intervalo de 48 a 84 h, posiblemente por una actividad pro-inflamatoria dominante.
- Los niveles de TGF-beta se elevan significativamente a las 24, 48 y 84 h después de la inyección intrahipocampal del β -amiloide desordenado, por lo que podría considerarse neuroprotector.
- No se detectó IL-10 en los intervalos de tiempo señalados.

BIBLIOGRAFIA

Abraham CR, Selkoe DJ, Potter H: Immunohistochemical identification of the serum protein inhibitor alpha-1 antichymotripsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Cell* 1988; 52:487-501.

Altstiel L, Sperber K: Cytokines in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1991; 15:481-495.

Alleva DG, Burger CJ, Elgert KD: Tumor-induced regulation of suppressor macrophage nitric oxide and TNF- α production. Role of tumor-derived IL-10, TGF- β , and prostaglandin E2. *J Immunol* 1994; 153:1674-1686.

Amara F, Junaid A, Clough R, Liang B: TGF- β 1, regulation of Alzheimer amyloid precursor protein mRNA expression in a normal human astrocyte cell line: mRNA stabilization. *Molecular Brain Research* 1999; 71:42-49.

Apelt J, Schliebs R: β -Amyloid-induced glial expression of both pro- and anti-inflammatory cytokines in cerebral cortex of aged transgenic Tg2576 mice with alzheimer plaque pathology. *Brain Research* 2001; 894:21-30.

Balasingam V, Yong VW: Attenuation of astroglial reactivity by interleukin-10. *J Neurosci* 1996; 16:2945-2955.

Baskin F, Smith GM, Fosmire JA, Rosenberg RN: Altered apolipoprotein E secretion in cytokine-treated human astrocyte cultures. *J Neurol Sci* 1997; 148:15-18.

Bauer J, Konig G, Strauss S, Jonas U, Ganter U, Weidemann A, Monning U, Masters CL, Volk B, Berger M, Beyreuther K: In-vitro matured human macrophages express Alzheimer's beta A-amyloid precursor protein indicating synthesis in microglial cells. *FEBS* 1991; 282:335-340.

Bauer J, Gauter U, Strauss S, Stadtmuller G, Frommberger U, Bauer H, Volk B, Berger M: The participation of interleukin-6 in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Res Immunol* 1992; 143:650-657.

Benveniste EN, Kwon JB, Chung WJ, Sampson J, Pandya K, Tang LP: Differential modulation of astrocyte cytokine gene expression by TGF- β . *J Immunol* 1994; 153:5210-5221.

Benveniste EN, Tang LP, Law RM: Differential regulation of astrocyte TNF- α expression by the cytokines TGF- β , IL-6 and IL-10. *Int. J. Devel. Neuroscience* 1995; 13(3/4):341-349.

Benveniste EN: Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998; 9:259-275.

Globe GC, Schieman WP, Lodish HF: Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 2000; 342 (18):1350.

Bluthé R-M, Castanon N, Pousset F, Bristow A, Ball C, Lestage J, Michaud B, Kelley KW, Dantzer R: Central injection of IL-10 antagonizes the behavioural effects of lipopolysaccharide in rats. *Psychoneuroendocrinology* 1999; 24:301-311.

Brugg B, Dubreuil YL, Huber G, Wollman EE, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J: Inflammatory processes induce b-amyloid precursor protein changes in mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:3032-3035.

Butterfield DA, Hensley K, Harris M, Mattson MP, Camey JM: beta -amyloid peptide free radical fragments initiate synaptosomal lipoperoxidation in a sequence-specific fashion: implications to Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 200:710-715.

Citron M, Westaway D, Xia W, Carlson G, Diehl T, Levesque G, Johnson-Wood K, Lee M, Seubert P, Davis A, Kholodenko D, Motter R, Sherrington R, Perry B, Yao H, Strome R, Lieberburg I, Rommens J, Kim S, Schenk D, Fraser P, St. George-Hyslop P, y Selkoe DJ: Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid β -protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med* 1997; 3:67-72.

Clarris HJ, Key B, Beyreuther K, Masters CL, Small DH: Expression of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease in the developing rat olfactory system. *Dev Brain Res* 1995. 88: 7-95.

COPE: TGF- β . Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia: <http://www.cope.cgi> Agosto 1999:1-15.

Chan SL, Griffin WST, Mattson MP: Evidence for caspase-mediated cleavage of AMPA receptor subunits in neuronal apoptosis and in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 1999; 57,315-323.

Chao CC, Hu S, Frey WH, Ala TA, Tourtellotte WW, Peterson PK: Transforming growth factor β in Alzheimer's disease. *Clin Diag Lab Immunol* 1994a; 1:109-110.

Chao CC, Ala TA, Hu S, Crossley KB, Sherman RE, Peterson PK, Frey WH: Serum cytokine levels in patients with Alzheimer's disease. *Clin Diagnost Lab Immunol* 1994b; 1:433-436.

Chao CC, Hu S, Sheng WS, Peterson PK: Tumor necrosis factor-alpha production by human fetal microglial cells: regulation by other cytokines. *Dev Neurosci* 1995; 17:97-105.

Chao CC, Hu S, Tsang M, Weatherbee J, Molitor T, Anderson W, Peterson P: Effects of transforming growth factor-beta on murine astrocyte glutamine synthetase activity. Implication in neuronal injury. *J Clin Invest* 1992; 90:1786-1793.

Da Cruz e Silva OAB, Iverfeldt K, Oltersdorf T, Sinha S, Lieberburg I, Ramabhadran TV, Suzuki T, Sisodia SS, Gandy S, y Greengard P: Regulated cleavage of Alzheimer b-amyloid precursor protein in the absence of the cytoplasmic tail. *Neuroscience* 1993; 57, 873-877.

Dash PK, Moore AN: Enhanced processing of APP induced by IL-1b can be reduced by indomethacin and nordihydroguaiaretic acid. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995; 208:542-548.

De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, deVries JE: Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine sintesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 reduced by monocytes. *J Exp Med* 1991; 174:1209-1220.

Diab A, Zhu J, Xiao BG, Mustafa M, Link H: High IL-6 and low IL-10 in tyhe central nervous system are associated with protracted relapsing EAE in DA rats. *J Neurophatol Exp Neurol* 1997; 56:641-650.

Dinarello CA: Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 1997a; 112:321S-329S.

Dinarello CA: Role of pro- and anti-inflammatory cytokines during inflammation: experimental and clinical findings. *J Biol Regul Homeostatic Agents* 1997b; 11:91-103.

Dinarello CA: Proinflammatory cytokines. *American College of Chest Physicians*. 2000; Volumen 118(2):503-508.

Eikelenboom P, Zhan SS, vanGool WA, Allsop D: Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol. Sci* 1994; 15:447-450.

El Khoury J, Hickman SE, Thomas CA, Cao L, Silverstein SC, Loike JD: Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature* 1996; 382(6593):716

CUCI



BIBLIOTECA CE

Finch CE, Laping NJ, Morgan TE, Nichols NR, Pasinetti GM: TGF-beta 1 is an organizer of responses to neurodegeneration. *J Cell Biochem* 1993; 53:314-322.

Flanders KC, Lippa CF, Smith TW, Pollen DA, Sporn MB: Altered expression of transforming growth factor- β in alzheimer's disease. *Neurology* 1995; 45:1561-1569.

Frei K, Lins H, Schwerdel C, Fontana A: Antigen presentation in the central nervous system. The inhibitory effect of IL-10 on MHC class II expression and cytokine production depends on the inducing signals and the type of cell analyzed. *J Immunol* 1994; 152:2720-2728.

Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, Guido T, Hagopian S, Johnson-Wood K, Khan K, Lee M, Leibowitz P, Lieberburg I, Little S, Masliah E, McConlogue L, Montoya-Zavala M, Mucke L, Paganini L, Penniman E, Power M, Schenk D, Seubert P, Snyder B, Soriano F, Tan H, Vitale J, Wadsworth S, Wolozin B, Zhao J: Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein. *Nature* 1995; 373(6514):523-527

Geng Y, Gulbins E, Altman A, Lotz M: Monocyte deactivation by interleukin 10 via inhibition of tyrosine kinase activity and the Ras signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:8602-8606.

Gitter BD, Cox LM, Rydel RE, May PC: Amyloid b peptide potentiates cytokine secretion by interleukin-1 b-activated human astrocytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:10738-10741.

Goodwin JL, Uemura E, Cunnick JE: Microglial release of nitric oxide by synergistic action of b-amyloid and IFN γ . *Brain Res* 1996; 692:207-214.

Greenberg SM, Cho HS, O'donnel LH, Rosand, J, Segal AZ, Younkin LH, Younkin SG, Rebeck GH: Plasma β -Amyloid Peptide, Transforming Growth Factor- β 1, and Risk for Cerebral Amyloid Angiopathy [Vascular Factors In Alzheimer'S Disease A: Part Iii. Cerebral Amyloid Angiopathy And Factors Regulating Cerebral Amyloidosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000;903:144-149.

Griffin WS, Stanley LC, Ling C, White L, MacLeod V, Perrot LJ, White CL III, Araoz C: Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:7611-7615.

Grilli M, Goffi F, Memo M, Spano P: Interleukin 1 b and glutamate activate the NF- κ B/Rel binding site from the regulatory region of the amyloid precursor protein gene in primary neuronal cultures. *J Biol Chem* 1996; 271:15002-15007.

Guo Q, Robinson N, and Mattson MP: Secreted APP_b counteracts the proapoptotic action of mutant presenilin-1 by activation of NF- κ B and stabilization of calcium homeostasis. *J Biol Chem* 1998; 273:12341-12351.

Hausmann E, Hao SY, Pace J, Sparely M: Transforming growth factor- β 1 and gamma-interferon provide opposing signals to lipopolysaccharide-activated mouse macrophage. *Infect Immun* 1994; 62:3625-3632.

Hensley K, Carney JM, Mattson MP: A model for beta -amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:3270-3274.

Higaki J, Quon D, Zhong Z, Cordell B: Inhibition of b-Amyloid formation identifies proteolytic precursors and subcellular site of catabolism. *Neuron* 1995; 14:651-632.

Horn JT, Estridge T, Pechous P, Hyslop PA: The amyloidogenic peptide human amylin augments the inflammatory activities of eosinophils. *J Leukoc Biol* 1995; 58:526-532.

Hopkins SJ y Rothwell NJ: Cytokines and the nervous system. I: expression and recognition. *Trends Neurosci* 1995;18:83-88.

Howard M, O'Garra A: Biological properties of interleukin 10. *immnol* 1992; 13:198-200.

Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G: Correlative memory deficits, Amyloid-b elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 1996 Oct 4; 274(5284):99-102

Ignotz RA; Massague J: Transforming growth factor- β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 1986; 261:4337-4345.

Ishii K, Muelhauser F, Liebl U, Picard M, Kühl S, Penke, B, Bayer T, Wiessler M, Hennerici M, Beyreuther K, Hartmann T, Fassbender K: Subacute NO generation induced by Alzheimer's b-amyloid in the living brain: reversal by inhibition of the inducible NO synthase. *FASEB J* 2000; 14(11): 1485-1489.

Jander S, Pohl J, D'Urso D, Gillen C, Stoll G: time course and cellular localization of interleukin-10 mRNA and protein expression in autoimmune inflammation of the rat central nervous system. *Am J Pathol* 1998; 152:975-982.

Kasai T, Inada K, Takakuwa T, Yamada Y, Inoue Y, Shimamura T, Taniguchi S, Sato S, Wakabayashi G, Endo S: anti-inflammatory cytokine levels in patients with septic shock. *Res Commun Mol pathol Pharmacol Sci* 1997; 98:34-42.

Kisilevsky R: Proteoglycans and other basement membrane proteins in amyloidoses. *Mol Neurobiol* 1994; 9:23-24.

Kronfol Z, Remick DG: Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. *Am J of Psychiatry* 2000; 157(5):683-694.

Lackey BR, Gray SL, Henricks DM: Does the Insulin-Like Growth Factor System Interact with Prostaglandins and Proinflammatory Cytokines During Neurodegeneration?. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 2000;224(1):20-27.

Lagadec P, Raynal S, Lieubeau B, Onier N, Arnould L, Saint-Giorgio V, Lawrence DA, Jeannin J-F: Evidence for control of nitric oxide synthesis by intracellular transforming growth factor- β 1 in tumor cells. *Am J of Pathol* 1999; 154:1867-1876.

Lanzrein AS, Johnston CM, Perry VH, Jobst KA, King EM, Smith AD: Longitudinal study of inflammatory factors in serum, cerebrospinal fluid, and brain tissue in Alzheimer disease: Interleukin-1 b, interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist, tumor necrosis factor- α , the soluble tumor necrosis factor receptors I and II, and a β 1-antichymotrypsin. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1998; 12:215-227.

Lawrence DA: Transforming growth factor-beta: a general review. *Eur Cytokine Netw* 1996; 7 (3):363.

Letterio JJ, Roberts AB: Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:137.

Leveugle B, Fillit H: Proteoglycans and the acute-phase response in alzheimer's disease brain. *Mol Neurobiol* 1994;9:24-32.

Lieb K, Fiebich BL, Schaller H, Berger M, Bauer J: Interleukin-1b and tumor necrosis factor- α induce expression of a β 1-antichymotrypsin in human astrocytoma cells by activation of nuclear factor- κ B. *J Neurochem* 1996; 67:2039-2044.

Lodge PA, Sriram S: Regulation of microglial activation by TGF- β , IL-10 and CSF-1. *J Leukocyte Biol* 1996; 60:502-508.

Logan A, Berry M, Gonzalez A, Frautsehy S, Sporn M, Baird A: Effects of transforming growth factor beta 1 on scar production in the injured central nervous system of the rat. *Eur J neurosci* 1994; 6:355-363.

London JA, Biegel D, Pachter JS: Neurocytopathic effects of β -amyloid-stimulated monocytes: a potential mechanism for central nervous system damage in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1996; 93:4147-4152.

Markesbery WR: The Role of Oxidative Stress in Alzheimer Disease. *Archives of Neurology* 1999; Volume 56(12):1449-1452.

Masliah E, Ho G, Wyss-Coray T: Functional role of TGF β in Alzheimer disease microvascular injury: lessons from transgenic mice. *International of Neurochemistry* 2001; 39:393-400.

Masliah E, Mallory M, Alford M, Tanaka S, y Hansen LA: Caspase dependent DNA fragmentation might be associated with excitotoxicity in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1998; 57:1041-1052.

Massague J: TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67:753-791.

Mattson MP: Cellular actions of b-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev* 1997; 77, 1081-1132.

Mattson MP, Barger SW, Furukawa K, Bruce AJ, Wyss-Coray T, Mark RJ, Mucke L; Cellular signaling roles of TGF beta, TNF alpha and beta APP in brain injury responses and alzheimer's disease. *Brain res Rev* 1997; 23:47-61.

Mattson MP, Rydell RE: Alzheimer's Disease: Amyloid ox-tox transducers. *Nature* 1996; 382(6593):674-675.

McGeer PL, Rogers J: Anti-inflammatory agents as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. *Neurology* 1992; 42:447-449.

McGeer PL, McGeer EG: The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev* 1995 Sep; 21(2):195-218.

McGeer, PL, Schulzer, M., McGeer, EG: Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease. *Neurology* 1996; 47:425-432.

Mehlhorn G, Hollborn M, Schliebs R: Induction of cytokines in glial cells surrounding cortical beta-amyloid plaques in transgenic Tg2576 mice with Alzheimer pathology. *Int J Dev neurosci* 2000; 18(4-5):423-431.

Meda L, Cassatella MA, Szendrei GI, Otvos L, Baron P, Villalba M, Ferrari D, Rossi F: Activation of microglial cells by b-amyloid protein and interferon-g. *Nature* 1995a; 374:647-650.

Meda L, Bonaiuto C, Szendrei GI, Ceska M, Rossi F, Cassatella MA: β -amyloid 25-35 induces the production of interleukin-8 from human monocytes. *J Neuroimmunol* 1995b; 59:29-34.

Meda L, Baron P, Prat E, Scarpini E, Scarlato G, Cassatella MA, Rossi F: Proinflammatory profile of cytokine production by human monocytes and murine microglia stimulated with β -amyloid (25–35). *J Neuroimmuno* 1998; 93:45-52.

Minghetti L, Polazzi E, Nicolini A, Levi G: Opposite regulation of prostaglandin E2 synthesis by transforming growth factor- β 1 and interleukin-10 in activated microglial cultures. *J Neuroimmunol* 1998; 82:31-39.

Mizuno T, Sawada M, Marunouchi T, Suzumura A: Production of IL-10 by mouse glial cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205:1907-1915.

Morgan NT, Nichols NR, Pasinetti GM, Finch CE: TGF- β 1 mRNA increases in macrophage/microglia cells of the hippocampus in response to a differentiation and kainic acid-induced neurodegeneration. *Exp Neurol* 1993; 120:291-301.

Morganti-Kossmann MC, Lenzlinger PM, Hans V, Stahel P, Csuka E, Ammann E, Stocker R, Treutz O, Kossmann T: production of cytokines following brain injury: beneficial and deleterious for the damage tissue. *Mol psychiatry* 1997; 2:133-136.

Nalbantoglu J, Tirado-Santiago G, Lahsaini A, Poirier J, Goncalves O, Verge G, Momoli F, Welner SA, Massicotte G, Julien JP, Shapiro ML: Impaired learning and LTP in mice expressing the carboxy terminus of the Alzheimer amyloid precursor protein. *Nature* 1997 May 29; 387(6632):500-5.

Pasinetti GM, Nichols NR, Tocco G, Morgan T, Laping N, Finch CE: Transforming growth factor beta 1 and fibronectin messenger RNA in rat brain: responses to injury and cell-type localization. *Neuroscience* 1993; 54:893-907.

Paxinos G, Watson Ch: The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press 1992; 1-71.

Peress NS, Perillo E: Differential expression of TGF- β 1,2,3 isotypes in Alzheimer's disease: a comparative immunohistochemical study with cerebral infarction, aged human and mouse control brains. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995; 54:802-811.

Ren RF, Flanders KC: Transforming growth factors- β protect rat hippocampal neuronal cultures from degeneration induced by β -amyloid peptide. *Brain Research* 1996; 732:16-24.

Ren FG, Hawver DB, Kim RS, Flanders KC: Transforming growth factor- β protects human hNT cells from degeneration induced by β -amyloid peptide: involvement of the TGF- β type II receptor. *Molecular Brain Research* 1997; 48:315–322.

Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith Jm, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, Fanci AS: Transforming growth factor type β :

- rapid induction of fibrosis and angiogenesis *in vivo* and stimulation of collagen formation *in vitro*. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83:4167-4171.
- Roberts AB, Sporn MB: Transforming growth factor- β . In Clark R: The molecular and cellular biology of wound repair. Plenus Press, New York 1996; 275-308.
- Rogers J: Inflammation as a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease. Drug Res 1995; 45:439-442.
- Rosales CS: Análisis cinético de interleucinas pro y anti-inflamatorias en el estrés oxidativo cerebral inducido *in vivo* por la proteína β A. Tesis U de G 2003.
- Rott O, Fleischer B, Cash E: Interleukin 10 prevent experimental allergic encephalomyelitis rats. Eur J Immunol 1994; 24:1434-1440.
- Selkoe DJ: Biochemistry of altered brain proteins in Alzheimer's disease. Ann Rev Neurosci 1989; 12:463-490.
- Soto C, Brames MC, Alvarez J, Inestrosa NC: Structural determinants of the Alzheimer's amyloid beta-peptide. J Neurochem 1994; 63:1191-1198.
- Spera PA, Ellison JA, Feuerstein GZ, Barone FC: IL-10 reduces rat brain injury following focal stroke. Letters Neuroscience 1998; 251:189-192.
- Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Burki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B: Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. Proc Natl Acad Sci U S A 1997 Nov 25; 94(24):13287-92.
- Sun JB, Xiao BG, Lindblad M, Li BL, Link H, Czerkinsky C, Holmgren J: Oral administration of cholera toxin B subunit conjugated to myelin basic protein protects against experimental autoimmune encephalomyelitis by inducing transforming growth factor-beta-secreting cells and supressing chemokine expression. Int Immunol 2000; 12:1449-1457.
- Symis P, Carter ND, Metcalfe JC, et. al.: Transforming growth factor-beta 1 gene polymorphisms and coronary artery disease. Clin Sci (Colch) 1998; 95 (6):659.
- Szczepanik AM, Funes S, Petko W, Ringheim GE: IL-4, IL-10 and IL-13 Modulate $\text{A}\beta(1-42)$ -induced cytokine and chemokine production in primary murine microglia and a human monocyte cell line. J Neuroimmunology 2001; 113:49-62.
- Teplow DB: Structural and kinetic features of amyloid beta-protein fibrillogenesis. Amyloid 1998; 5:121-142.

Tomita S., Kirino Y., and Suzuki T: Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein (APP) by secretases occurs after O-glycosylation of APP in the protein secretory pathway. *J. Biol. Chem* 1998; 273:6277-6284.

Van der Wal EA, Gomez-Pinilla F, Cotman CW: Transforming growth factor-b1 is in plaques in alzheimer and down pathologies. *Neuroreport* 1993; 4:69-72.

Venters HD, Dantzer R, and Kelley KW: A new concept in neurodegeneration: TNF is a silencer of survival signals. *Trends in Neurosciences* 2000, 23:175-180.

Vergelli M, Mazzanti B, Ballerini C, Gran B, Amaducci L, Massacesi L: transforming growth factor - β 1 inhibits the proliferation of rat astrocytes induced by serum and growth factors. *J Neurosci Res* 1995; 40:127-133.

Vitkovic L, Bockaert J, Jacque C: "Inflammatory " Cytokines. Neuromodulators in Normal brain ?. *J Neurochem* 2000; 74(2):457-471

Vodovotz Y, Bogdan C, Paik J, Xie QW, Nathan C: Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor- β 1. *J Exp Med* 1993; 178:605-613.

Weldon DT, Rogers SD, Ghilardi JR, Finke MP, Cleary JP, O'Hare E, Esler WP, Maggio JE, Mantyh PW: Fibrillar β -Amyloid Induces Microglial Phagocytosis, expression of inducible nitric oxide synthase, and loss of a select population of neurons in the rat CNS *in vivo*. *J Neurosci* 1998; 18(6):2161-2173.

Weller M, Fontana A: The failure of current immunotherapy for malignant glioma. Tumor derived TGF- β , T cells apoptosis, and the immune privilege of the brain. *Brain Res Rev* 1995; 21:128-151.

Williams K, Dooley N, Ulvestad E, Becher B, Antel JP: IL-10 production by adult human derived microglial cells. *Neurochem* 1996; 29:55-64.

Wyss-Coray T, Feng L, Masliah E, Ruppe MD, Toggas SM, Rockenstein EM: Increased central nervous system production of extracellular matrix components and development of hydrocephalus in transgenic mice overexpressing transforming growth factor β 1. *Am J Pathol* 1995; 147:53-67.

Wyss-Coray T, Lin C, Sanan DA, Mucke L, Masliah E: Chronic overproduction of transforming growth factor- β 1 by astrocytes promotes Alzheimer's disease-like microvascular degeneration in transgenic mice. *Am J Pathol* 2000; 156(1):139-150.

Wyss-Coray T, Masliah E, Mallory M, McConlogue L, Johnson-Wood K, Lin C: Amyloidogenic role of cytokine TGF-Beta-1 in transgenic mice and in alzheimer's disease. *Nature* 1997; 389:603-606.

Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Migheli A, Nawroth P, Stern D, Schmidt AM: RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 1996; 22;382(6593):685-91.

Yankner BA: Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron* 1996; 16(5):921-32.

Zhai QH, Futrell N, Chen FJ: Gene expression of IL-10 in relationship to TNF alpha, IL-1 beta and IL-2 in the rat following middle cerebral artery occlusion. *J Neurol Sci* 1997; 152:119-124.

Zhong Z, Higaki J, Murakami K, Wang Y, Catalano R, Quon D, Cordell B: Secretion of b-Amyloid precursor protein involves multiple cleavage sites. *J Biol Chem* 1994; 269:627-632.

Zhu, Haiyan; Fu, Weiming; Mattson, Mark P: The Catalytic Subunit of Telomerase Protects Neurons Against Amyloid [beta]Peptide-Induced Apoptosis. *J Neurochem* 2000; 75(1):117-124