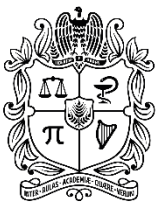


UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación del potencial terapéutico de un extracto de raíz de *Zanthoxylum caribaeum* en un modelo triple transgénico de Enfermedad de Alzheimer

Juan Carlos Ruiz González

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, D.C, Colombia

2021

Evaluación del potencial terapéutico de un extracto de raíz de *Zanthoxylum caribaeum* en un modelo triple transgénico de Enfermedad de Alzheimer

Juan Carlos Ruiz González

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Bioquímica

Director (a):

Ph.D Adrián Gabriel Sandoval Hernández

Línea de Investigación:

Enfermedades Neurodegenerativas

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Muerte Celular

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2021

Dedicatoria

A mis padres Ana Cecilia y Pedro Miguel, por su apoyo incondicional y su infinito amor

.

A mi hermana Nelly, por ser inspiración, guía y luz

A mi familia, por su apoyo y cariño

“Aun cuando haya pasado por todo lo que pasé, no me arrepiento de los problemas en que me metí, porque fueron ellos los que me condujeron hasta donde deseé llegar. Ahora, todo lo que tengo es esta espada, y la entrego a cualquiera que desee seguir su camino. Llevo conmigo las marcas y las cicatrices de los combates; ellas son testimonio de lo que viví, y recompensas de lo que conquisté”.

John Bunyan

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

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

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

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

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

Nombre Juan Carlos Ruiz González

Fecha 23/04/2021

Fecha

Agradecimientos

Los autores agradecemos al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, por la financiación de esta investigación mediante el proyecto: “Búsqueda racional de alcaloides isoquinolínicos del género *Zanthoxylum* (Rutaceae) como posibles agentes neuroprotectores para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer" Código 110177758004, convocatoria 777-2017" -RC-854 de 2017.

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

Al profesor Adrián Gabriel Sandoval Hernández por la dirección de este trabajo

Al profesor Gonzalo Arboleda Bustos por la constante revisión del trabajo y sus acertadas recomendaciones.

A la profesora Mónica Ávila Murillo por permitirme hacer parte del proyecto de investigación “Búsqueda racional de alcaloides isoquinolínicos del género *Zanthoxylum* (Rutaceae) como posibles agentes neuroprotectores para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer" que financió este trabajo.

A los profesores Martha Lucía Serrano, Adriana Umaña, Claudia Consuelo Burbano, Mauricio Urquiza y Nohora Vega por su acompañamiento y guía en cada fase de mi proceso de crecimiento en la maestría.

A mis compañeros del laboratorio: Jennifer Caicedo, Luis Felipe Hernández, Juan Felipe León, Daniel Santos, Andrés Bustamante y Gina Guio, por su apoyo incondicional y constante.

A Blanca E. Schroeder López por su apoyo, compañía y comprensión durante el proceso de mi maestría.

A Magda Yaneth López por su valiosa colaboración en los aspectos administrativos del manejo de proyectos.

A mi familia por su afecto y cariño, especialmente a mis padres Ana Cecilia y Pedro Miguel, por su infinito amor y dedicación, y a mi hermana Nelly Ruiz por ser inspiración y ejemplo de persistencia y bondad.

A la facultad de Ciencias, el Departamento de Química y el Instituto de Genética por brindarme la oportunidad de realizar uno de mis sueños.

A la maravillosa energía universal que alineó mi camino, alivió las cargas y me dio fortaleza en los momentos más difíciles.

Resumen

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la principal causa de demencia en el mundo, se proyecta como el mayor problema de salud pública en el mundo para el año 2050. Su etiología es desconocida, se caracteriza por la pérdida progresiva de la memoria y patológicamente por la acumulación de péptidos beta-amiloide (Aβ) y la proteína Tau-hiperfosforilada. La hipótesis amiloide es la más aceptada, postula que el origen de la enfermedad comienza con la acumulación de Aβ, conlleva a procesos inflamatorios, desregulación de quinasas, incremento de especies reactivas de oxígeno, reducción de células madre neuronales, perdida de espinas dendríticas y muerte neuronal, explicando la demencia. Se ha evidenciado que la activación farmacológica de los receptores X hepáticos (LXR) en modelos animales de EA ha producido mejoría cognitiva asociada con incremento de expresión de las proteínas APOE y ABCA1, reducción de astrogliosis y microgliosis, protección de la plasticidad sináptica y espinas dendríticas. Los productos naturales vegetales han representado una fuente promisoria de moléculas bioactivas de características multimodales para el tratamiento de la EA, debido a sus altas cantidades de compuestos alcaloidales. Por su parte, *Zanthoxylum caribaeum* es una especie arbórea perteneciente a la familia *Rutaceae* que ha sido seleccionada luego de un amplio screening de plantas colombianas por su alto contenido de alcaloides, actividad agonista de LXRs, antiagregante de Aβ, antioxidante e inhibidora de acetilcolinesterasas in vitro. El objetivo de este trabajo fue de evaluar el efecto de un extracto etanolico de *Zanthoxylum caribeum* en un modelo in vivo de EA. Se realizó la administración oral a ratones triple-transgenicos de EA (3xTg-AD) y controles, encontrando mejoría de la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris, incremento en la expresión de ABCA1 y ApoE, reducción del marcaje para marcadores moleculares de progresión de la EA. Adicionalmente, se observó un incremento en la expresión de proteínas asociadas con la función sináptica Sinapsina1, Shank 1/2/3 y PSD-95. En conclusión, se describió el efecto de un extracto etanólico crudo de *Zanthoxylum caribaeum* sobre los principales marcadores fisiopatológicos de la EA con potencial uso terapéutico en el modelo 3xTg-AD.

Palabras clave: Enfermedad de Alzheimer, Productos Naturales Vegetales, LXR, ApoE, *Zanthoxylum caribaeum.*

Abstract

Evaluation of the therapeutic potential of a *Zanthoxylum caribaeum* root extract in a triple transgenic model of Alzheimer disease

Alzheimer's disease (AD) is the main cause of dementia worldwide, it is projected as the largest public health problem in the world by the year 2050. Its etiology is unknown, it is characterized by progressive memory loss and pathologically by the accumulation of beta-amyloid peptides (Aβ) and the hyperphosphorylated Tau protein. The amyloid hypothesis is the most accepted, it postulates that the origin of the disease begins with the accumulation of Aβ, which leads to inflammatory processes, dysregulation of kinases, increase in reactive oxygen species, reduction of neuronal stem cells, loss of dendritic spines and death. neuronal, explaining dementia. It has been shown that the pharmacological activation of hepatic X receptors (LXR) in animal models of AD has produced cognitive improvement associated with increased expression of APOE and ABCA1 proteins, reduction of astrogliosis and microgliosis, protection of synaptic plasticity and dendritic spines. Natural products derived from plants have represented a promising source of bioactive molecules with multimodal characteristics for the treatment of AD, due to their high amounts of alkaloidal compounds. *Zanthoxylum caribaeum* is an arboreal species belonging to the Rutaceae family that has been selected after an extensive screening of Colombian plants for its high alkaloid content, LXRs agonist activity, Aβ antiaggregant, antioxidant and inhibitor of acetylcholinesterase in vitro. The objective of this work is to evaluate the effect of an ethanolic extract of *Zanthoxylum caribaeum* in the triple transgenic model of Alzheimer´s disease (3xTg-AD). Oral administration to triple-transgenic EA (3xTg-AD) mice and controls was performed, finding improvement in spatial memory in the Morris water maze, increased expression of ABCA1 and ApoE, reduction of expression for molecular markers of progression of the EA. Additionally, an increase in the expression of proteins associated with the synaptic function Synapsin1, Shank 1/2/3 and PSD-95 was observed. In conclusion, the effect of a crude ethanolic extract of *Zanthoxylum caribaeum* on the main pathophysiological markers of AD with potential therapeutic use in the 3xTg-AD model was described.

Keywords: Alzheimer´s disease, Natural Vegetal Products, LXR, ApoE, *Zanthoxylum caribaeum.*

Contenido

Pág.

Resumen ..... **XI**

Lista de figuras ..... **XVII**

Lista de tablas ..... **XIX**

Lista de Símbolos y abreviaturas ..... **XX**

Introducción **1**

1. Estado del Arte **5**
1.1 Enfermedad de Alzheimer 5
1.2 Rol de Apolipoproteína E (ApoE) en EA 8
1.3 Receptores nucleares y EA 9
1.3.1 Receptores X del Hígado (LXR) y EA 9
1.3.2 Ligandos de LXR 10
1.4 Plasticidad sináptica y EA 11
1.4.1 Espinas dendríticas y EA 13
1.5 Alteraciones en la mielinización y EA 15
1.6 Neurogénesis adulta 17
1.7 Rol de la vía de señalización fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en AD 18
1.8 Alternativas Terapéuticas 19
1.8.1 Productos Naturales Vegetales como candidatos a fármacos para EA 20
1.8.2 Modelo animal triple transgénico de EA 23

2. Justificación **25**

3. Objetivos **29**
3.1 Objetivo General 29
3.2 Objetivos específicos 29

4. Materiales y Métodos **31**
4.1 Modelo animal 31
4.2 Diseño experimental 31
4.3 Laberinto Acuático de Morris 32
4.4 Inmunofluorescencia 33
4.4.1 Análisis de microscopía confocal 35
4.5 Evaluación de la expresión de proteínas 36
4.5.1 Extracción y cuantificación de proteína 36
4.5.2 Western Blot 36

4.5.3 Análisis Estadístico 38

5. Resultados 39
5.1 *Zanthoxylum caribaeum* mejora la memoria espacial en animales 3xTg-AD 39
5.2 *Zanthoxylum caribaeum* reduce la patología amiloide y Tau en animales 3xTg-AD 43
5.3 *Zanthoxylum caribaeum* reduce la inmunoreactividad de GFAP en animales 3xTg-AD 49
5.4 *Zanthoxylum caribaeum* reduce la inmunoreactividad de Iba-1 en animales 3xTg-AD 55
5.5 El tratamiento con *Zanthoxylum caribaeum* aumenta la inmunoreactividad para ApoE en animales 3xTg-AD 60
5.6 *Zanthoxylum caribaeum* incrementó la expresión de marcadores del linaje de mielina 64
5.7 El tratamiento con *Zanthoxylum caribaeum* aumenta la inmunoreactividad para el marcador Shank 1-2-3 en animales 3xTg-AD 68
5.8 El tratamiento con *Zanthoxylum caribaeum* no tiene efecto sobre la expresión de marcadores de proliferación en el DG de animales 3xTg-AD 73
5.9 Efecto de un tratamiento con dosis 50 mg/kg/día del extracto de *Zanthoxylum caribaeum* sobre los marcadores patológicos de la EA 76
5.10 El tratamiento con extracto de raíz de *Zanthoxylum caribaeum* está implicado en la activación de la vía PI3K/Akt en modelo triple transgénico de la EA. 80

6. Análisis de Resultados 81

7. Conclusiones y recomendaciones 89
7.1 Conclusiones 89
Recomendaciones 90

Bibliografía 93

Lista de figuras

Pág.

Figura 1-1 Modelo de clivaje de la proteína APP para dar lugar a la formación del péptido Aβ por la vía amiloidogénica. 7
Figura 1-2 Morfología de *Zanthoxylum caribaeum*. (a). Hábito. **(b)** Inflorescencia. **(c)**. Flor masculina evidenciando estambres y pistilo. d. Gineceo e. Folículo abierto. 22
Figura 2-1 Estimación del comportamiento de la EA hasta el año 2050, discriminado por territorios con altos y bajos ingresos económicos, resaltando el aumento de la prevalencia en países del tercer mundo. 26
Figura 4-1 Esquema representativo del diseño de la prueba comportamental 33
Figura 5-1 Resultados Prueba de aprendizaje luego de 18 semanas de tratamiento con el extracto de *Zanthoxylum caribaeum*: 40
Figura 5-2 Estrategias de navegación espacial utilizadas durante la prueba de aprendizaje 41
Figura 5-3 Resultados prueba de retención 42
Figura 5-4 Efecto de *Zanthoxylum caribaeum* sobre el área de inmunoreactividad para Aβ. 44
Figura 5-5 El extracto de *Zanthoxylum caribaeum* reduce de forma significativa la patología tau 47
Figura 5-6 El extracto de *Zanthoxylum caribaeum* reduce la astrogliosis en animales 3xTg-AD 50
Figura 5-7 El tratamiento con *Zanthoxylum caribaeum* reduce la inmunoreactividad para GFAP en las diferentes regiones de hipocampo y la corteza. 53
Figura 5-8 El extracto de *Zanthoxylum caribaeum* reduce la inmunoreactividad para Iba-1 en animales 3xTg-AD 56
Figura 5-9 El tratamiento con *Zanthoxylum caribaeum* reduce la inmunoreactividad para Iba-1 en animales 3xTg-AD 58
Figura 5-10 Efecto del extracto de *Zanthoxylum caribaeum* en la inmunoreactividad para marcador ApoE 60
Figura 5-11 Micrografías representativas de la inmunoreactividad de Olig2 (Verde) obtenidas por microscopía confocal 64
Figura 5-12 Micrografías representativas de la inmunoreactividad para +MBP (Rojo) obtenidas por microscopía confocal 66
Figura 5-13 Efecto del extracto de *Zanthoxylum caribaeum* en la inmunoreactividad para marcador Shank1-2-3 69

Figura 5-14 Efecto del extracto de *Zanthoxylum caribaeum* en la inmunoreactividad para marcador Sinapsina-1 71
Figura 5-15 Efecto de *Zanthoxylum caribaeum* sobre el número de células proliferantes en la SGZ del DG 73
Figura 5-16 Efecto de *Zanthoxylum caribaeum* sobre la inmunoreactividad +Nestin en la SGZ del DG 74
Figura 5-17 El extracto de *Zanthoxylum caribaeum* incrementa los niveles de ABCA1 y ApoE en corteza 77
Figura 5-18 El extracto de *Zanthoxylum caribaeum* no tiene efecto en el marcaje para Iba-1 en corteza 77
Figura 5-19 El extracto de raíz de *Zanthoxylum caribaeum* aumenta la expresión de PSD-95 en corteza 78
Figura 5-20 El extracto de raíz de *Zanthoxylum caribaeum* aumenta la expresión de Sinapsina-1 en corteza 79
Figura 5-21 El extracto de *Zanthoxylum caribaeum* incrementa los niveles de AKT fosforilado (p-AKT) en corteza 80

Lista de tablas

Pág.

Tabla 4-1 Diseño experimental administración de tratamientos en animales 3xTg-AD de doce meses de edad para inmunofluorescencia. 32
Tabla 4-2 Anticuerpos primarios usados para inmunofluorescencias de cortes de tejido criopreservados 35
Tabla 4-3 Anticuerpos secundarios usados para inmunofluorescencia 35
Tabla 4-4 Anticuerpos primarios usados para Western Blot 37
Tabla 4-5 Anticuerpos secundarios usados para Western Blot 37

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
3xTg-AD	Modelo Animal Triple Transgénico de la Enfermedad de Alzheimer
ABCA1	ATP binding cassette subfamily A member 1
ABCG1	ATP-binding cassette sub-family G member 1
AChE	Acetilcolinesterasa
ADAM-10	α-secretasa
AICD	Dominio intracelular de proteína precursora amiloide
AINEs	Antinflamatorios no esteroideos
Akt	Proteína cinasa B
ApoE	Apolipoproteína E
APP	Proteína precursora amiloide
Aβ	Amiloide Beta
BACE	β-secretasa
BDNF	Factor Neurotrófico derivado del cerebro
ChREBP	Proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos
CREB	Elemento de respuesta a AMPc
DG	Giro Dentado del hipocampo
EA	Enfermedad de Alzheimer
EOAD	Enfermedad de Alzheimer de origen temprano (familiar)
ephR2	Receptor de efrina
FDA	Agencia de Administración de Alimentos y Medicamentos
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HRE	Elemento de respuesta a la hormona
lL23α	Interleucina 23-α
KD	Dominio Kunitz inhibidor de proteasas
LBD	Dominio de unión a ligando
LOAD	Enfermedad de Alzheimer de origen tardío (esporádica)
LRP	Low density lipoprotein receptor-related protein
LTD	Depresión de Largo Término
LTP	Potenciación de Largo Término
LXR	Receptor X hepático
MAPs	Proteínas asociadas a microtúbulos
MBP	Proteína Básica de Mielina
mGluR	Receptor de glutamato metabotrópico
MWM	Laberinto Acuático de Morris
NMDAR	Receptor N-metil D-aspartato
oAβ	Oligómeros de Aβ

Abreviatura	Término
OPC	Célula precursora de oligodendrocitos
Ox-2	Dominio antígeno Ox-2 corto
PI3K	Fosfatidil-inositol-3-cinasa
PrP	Proteína priónica
PS1	Presenilina 1
PS2	Presenilina 2
PSD	Proteína de la densidad postsináptica
RIPs	Registros individuales de prestación de servicios de salud
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RXR	Receptor X Retinoide
sAPPα	Fragmento soluble de proteína APP por el clivaje de α secretasa
SGZ	Zona subgranular del giro dentado del hipocampo
SNC	Sistema Nervioso Central
SREBP-1c	Elemento regulador del esterol
Syn1	Sinapsina-1
Syp	Sinaptofisina

Introducción

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la demencia más común, afectando a 46,8 millones de personas a nivel mundial, y suponiendo una alta carga económica y social para los países en vías de desarrollo. Se estima que para 2030, la EA generará un costo aproximado de 818 billones de dólares a nivel mundial. En Colombia, la EA afecta a 221,000 personas y se ha determinado una prevalencia de 1.8 y 3.4% en pacientes mayores de 65 y 75 años (Alzheimer's Disease International, 2015). En virtud de la inversión de la pirámide poblacional, se espera que los índices de prevalencia aumenten, estimando cifras de 4.1 y 9.1% proyectado a 2020 y 2040 en la región latinoamericana. Este aumento de la prevalencia se relaciona con una proyección semejante en el aumento de los gastos en salud pública, superando para el año 2050 los costos generados por otras enfermedades crónicas no transmisibles como el cáncer y enfermedades cardiovasculares (Garre-Olmo, 2018).

La EA tiene dos formas de presentación: EA de inicio temprano (EOAD [Early Onset Alzheimer´s Disease] por sus siglas en inglés) ocasionada por mutaciones de pérdida de sentido y herencia autosómica dominante en los genes Proteína Precursora Amiloide (APP) (cromosoma 21), Presenilina-1 (PS1) (cromosoma 14) y Presenilina 2 (PS2) (cromosoma 1), de menor frecuencia (5%) y la EA de inicio tardío (LOAD [Late Onset Alzheimer´s Disease] por sus siglas en inglés), caracterizada por su aparición tardía con punto de corte a los 65 años y una frecuencia del 95% del total de los casos, considerada una enfermedad esporádica de origen multifactorial, con un componente de riesgo ambiental y genético. El principal factor de riesgo genético descrito es el genotipo de la proteína transportadora de lípidos ApoE, siendo el alelo ε4 el que confiere mayor riesgo y ε2 el que genera neuroprotección (Kim, Basak, & Holtzman, 2009)(Selkoe, 2018). Teniendo en cuenta los múltiples factores que pueden condicionar la aparición y desarrollo de LOAD, el diseño de posibles agentes farmacológicos dirigidos a blancos moleculares característicos de la enfermedad ha sido un reto para la comunidad científica.

Teniendo como base los eventos fisiopatológicos que desencadenan las características clínicas de la EA, se han formulado hipótesis que postulan el origen de la enfermedad, y sugieren blancos moleculares específicos para su tratamiento. La hipótesis más destacada y aceptada es la hipótesis amiloide formulada por Glenner (Glenner & Wong, 1984), la cual postula que la acumulación de péptidos Aβ en forma de placas amiloides (placas seniles) es el evento que desencadena los cambios fisiopatológicos y moleculares que explican la enfermedad. Por otra parte, se han postularon hipótesis como la colinérgica formulada por Bartus (Bartus, Iii, Beer, & Lippa, 1982) que argumenta que la pérdida de la actividad colinérgica determina el deterioro de las funciones mentales en EA (Craig, Hong, & McDonald, 2011), la hipótesis glutamatérgica sostiene que la disfunción de este tipo de sinapsis está relacionada con el incremento en el estrés oxidativo asociado los péptidos Aβ (Butterfield & Pocernich, 2003) y la hipótesis tau que sostiene que la alteración de proteínas kinasas y fosfatasas desencadena la hiperfosforilación de la proteína tau desencadenando el daño neuronal (Kametani & Hasegawa, 2018).

El tratamiento convencional de la EA comprende dos grandes grupos de fármacos; inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (AChEi) encargados de preservar la función sináptica colinérgica al aumentar la disponibilidad de la acetilcolina en el botón sináptico, y antagonistas del receptor N-metil D-aspartato (NMDA), responsables de evitar el daño neuronal por excitotoxicidad por sobreactivación de receptores NMDA (Massoud & Gauthier, 2010). Aunque estos fármacos han sido aprobados por la FDA para el tratamiento de la EA, su uso se ha relacionado con efectos adversos y beneficios limitados, generando un alivio sintomático que no se relaciona con el ataque a un blanco molecular específico que daría inicio y sería la causa de la enfermedad.

La investigación de los mecanismos etiopatogénicos de la EA ha propiciado la formulación de nuevos fármacos que no se encuentran relacionados con la modulación colinérgica. Estos incluyen terapia con células madre, terapia hormonal, medicamentos anti hipertensivos, estatinas, inhibidores de la fosfodiesterasa, inhibidores de la agregación de Aβ, inhibidores de la fosforilación de tau, antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) e inmunoterapia contra el péptido Aβ, entre otros (Dey, Bhattacharya, Mukherjee, & Pandey, 2017). El efecto de estas terapias no ha

logrado generar un desenlace clínico favorable, por lo cual se están investigando nuevos mecanismos de intervención farmacológica que posibiliten una mejoría clínica sostenida en el tiempo.

Recientemente se ha logrado un avance significativo en el conocimiento de nuevos candidatos a fármacos provenientes de productos naturales vegetales. Los estudios fitoquímicos y quimiotaxonómicos de plantas colombianas de las familias *Myristicaceae, Rutaceae, Lauraceae* y *Piperaceae* han mostrado un efecto positivo en la fisiopatología de la EA en estudios preliminares con líneas celulares neuronales, lo que facilita el estudio de estos mecanismos en modelos más complejos como el modelo murino triple transgénico de la EA. Por sus altos contenidos de terpenos, esteroles, limonoides, fenoles, lignanos, cumarinas, alcaloides, y particularmente por su contenido de moléculas con actividad agonista de receptores nucleares X hepáticos, los extractos de productos naturales vegetales de las familias mencionadas tienen una potencial actividad antiinflamatoria, captadora de radicales libres y, de manera importante, modulación transcripcional de la expresión de proteínas ABCA1 y ApoE implicadas en el metabolismo y remoción cerebral del péptido AB, produciendo mejoría cognitiva a través de distintos mecanismos neuroprotectores.

1. Estado del Arte

1.1 Enfermedad de Alzheimer

La EA es un desorden neuropatológico, caracterizado por acumulación de péptidos β-amiloides (péptidos Aβ) que forman agregados extracelulares denominados placas amiloides y proteína tau altamente fosforilada que forma agregados intracelulares denominados ovillos neurofibrilares. Clínicamente la EA se caracteriza por un deterioro progresivo y gradual de la función cognitiva relacionado con pérdida de la memoria a corto y mediano plazo, afasia (alteración del lenguaje), apraxia (deterioro de la capacidad motora), agnosia (fallo en el reconocimiento de objetos) y alteraciones de la ejecución (planificación, secuenciación y abstracción) que condiciona la aparición de demencia (A. P. Association, 1995).

La EA fue descrita en 1906 en una mujer de 55 años por Alois Alzheimer, quien a partir de la autopsia describió atrofia cerebral global, cambios vasculares arterioescleróticos, y acumulación de agregados proteicos, y sugirió la hipótesis de acumulación de una sustancia en el cerebro responsable de los cambios neuropatológicos encontrados (Stelzmann, Norman Schnitzlein, & Reed Murtagh, 1995).

Las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares son los marcadores histopatológicos de la EA. Las placas amiloides se componen de agregados de péptidos β amiloides en su forma fibrilar. Previo a la agregación en fibrillas, los péptidos Aβ forman estructuras en estados monoméricos y oligoméricos dando lugar a protofibrillas, que se agregan subsecuentemente formando fibrillas y placas amiloides en el espacio extracelular (Rauk, 2008). Por su parte, los ovillos neurofibrilares se componen de inclusiones fibrilares intracelulares en las dendritas de las neuronas afectadas, compuestas de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs), y en mayor medida de la proteína Tau altamente fosforilada (Price, Borchelt, & Wong, 2005).

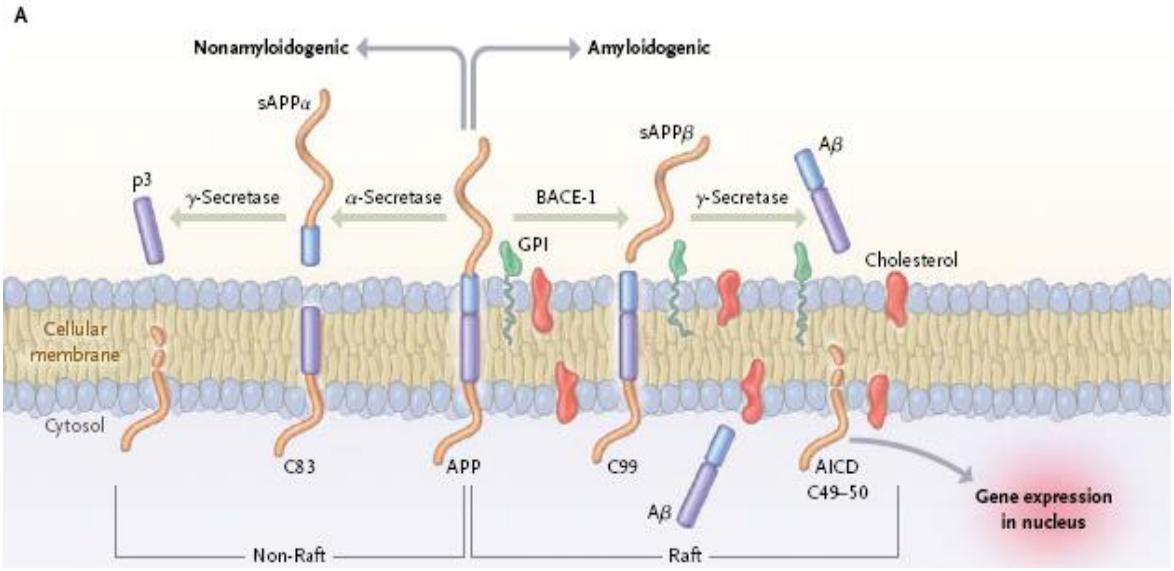
La hipótesis amiloide propuesta por George Glenner (Glenner & Wong, 1984) es la más aceptada por la comunidad científica para el entendimiento de los mecanismos etiopatogénicos que dan cuenta de las alteraciones encontradas en la EA. Las mutaciones en los genes de APP, PS1 y PS2 (EOAD) o algún evento de causa desconocida relacionado con la presencia de uno o más factores de riesgo (LOAD) predisponen al clivaje amiloidogénico de APP, y la acumulación y oligomerización de péptidos Aβ los cuales se depositan gradualmente como oligómeros formando posteriormente placas difusas (fibrillas y protofibrillas) con la consecuente activación de la microglía y los astrocitos produciendo una respuesta neuroinflamatoria. Estos eventos en conjunto pueden determinar la alteración de la plasticidad sináptica, la homeostasis iónica, la actividad de proteínas kinasas y fosfatasas que fosforilan la proteína tau, un proceso que produce finalmente la disfunción sináptica dependiente de la pérdida neuronal selectiva y déficit en el pool de neurotransmisores, y que explica la disfunción sináptica y la demencia (Selkoe & Hardy, 2016).

La proteína APP es codificada por un gen que produce tres isoformas por splicing diferencial; APP_{695}, APP_{751} y APP_{770}. Las variantes más largas APP751 y APP770, expresan uno (APP751) o dos (APP770) de los exones que codifican para el Dominio Kunitz inhibidor de Proteasa (KD) o el dominio antígeno Ox-2 corto (Ox–2), mientras que la isoforma APP695 carece de estos dominios (Suzuki, 2014). Las neuronas expresan predominantemente la isoforma APP695, mientras que APP751 y APP770 son expresadas en tejidos periféricos y fibroblastos (Müller, Deller, & Korte, 2017)(Suzuki, 2014).

El clivaje de APP en el cerebro se puede producir de manera patogénica y no patogénica (**Figura 1-1**). La vía no patogénica también llamada vía no amiloidogénica, implica inicialmente el clivaje de APP por la enzima α-secretasa (ADAM10) seguido del complejo γ-secretasa produciendo un péptido sAPPα soluble (que puede unirse como ligando a APP en membrana y conferir neuroprotección vía receptores acoplados a Proteína G) y un fragmento P3. La vía patogénica es denominada vía amiloidogénica, inicia con el clivaje de APP se produce por β (BACE1) y γ secretasas, liberando un fragmento sAPPβ y el péptido Aβ. En los dos casos, el corte de γ secretasa se da en el extremo carboxi-terminal en una serie de pasos que inician con un corte endoproteolítico liberando el fragmento carboxi-terminal intracelular AICD que es traslocado al núcleo como regulador transcripcional, continuando con cortes exoproteolíticos hacia el extremo N-terminal (Gralle

et al., 2006). Dado que APLP1 y APLP2 no contienen el dominio Aβ, no pueden ser clivadas por la vía amiloidogénica. Se ha observado que el clivaje amiloidogénico de APP ocurre de manera más frecuente en microdominios de la membrana denominados “balsas lipídicas”, ricos en colesterol y esfingolípidos, lo que se ha sugerido ocurre porque BACE1 se distribuye predominantemente en este tipo de membranas (Simons, Ehehalt, Simons, & Ehehalt, 2002).

Figura 1-1 Modelo de clivaje de la proteína APP para dar lugar a la formación del péptido Aβ por la vía amiloidogénica.



Fuente: (Querfurth, LaFerla, 2010)

La remoción del péptido Aβ puede llevarse a cabo vía degradación por enzimas como neprilisina y enzima degradadora de insulina, transporte a neuronas y degradación intracelular, transporte vía receptores LRP1 a través de la barrera hematoencefálica y, eun última medida, acumulación vascular (angiopatía cerebral amiloide). Uno de los mecanismos más estudiados es el transporte por lipoproteínas de alta densidad (HDL por sus siglas en inglés) cuya formación en el tejido cerebral está dada principalmente por las proteínas transportadoras ApoE y ApoA1. El transporte del péptido en el complejo ApoE-Aβ facilita la unión a receptores de lipoproteínas como “Low density lipoprotein receptor-related protein” (LRP1, por sus siglas en ingles) en células de la microglía para su posterior degradación endolisosomal.

1.2 Rol de Apolipoproteína E (ApoE) en EA

La apolipoproteína E (ApoE) forma lipoproteínas consideradas las principales transportadoras de colesterol en el cerebro. El gen de APOE en humanos se localiza en el cromosoma 19, de este se conocen diferentes polimorfismos, produciendo tres variantes alélicas comunes en la población (ε2, ε3, ε4); las frecuencias alélicas determinan que ε3 es el más abundante (77%) y ε2 el menor (8%). La frecuencia del alelo ε4 es del 15%, y adicionalmente representa el 40% de los pacientes con EA de inicio tardío (LOAD). Este efecto tiene un máximo entre los 60 y 70 años, correspondiente a las características de inicio de LOAD (Bu, 2009).

Estructuralmente APOE es una proteína de 299 aminoácidos con un peso de 34 kDa. Una de sus principales funciones es formar lipoproteínas. APOE es reconocido por receptores de membrana. Las isoformas (ε2, ε3, ε4) difieren en los residuos de las posiciones 112 y 158; la isoforma apoE2 que confiere neuroprotección contiene cisteínas en las dos posiciones, la isoforma ApoE3 cambia la posición 158 por un residuo de Arginina, y la isoforma E4 presenta argininas en las dos posiciones. La razón por la cual ApoE ε4 produce mayor riesgo aun no es completamente claro, sin embargo, se sabe que esta estructura determina una menor afinidad de la isoforma E4 por los receptores para ApoE, una mayor inestabilidad estructural por la incapacidad de formar puentes disulfuro, y la tendencia a formar agregados globulares con alto potencial neurotóxico (Zhong & Weisgraber, 2009).

En el sistema nervioso central, ApoE es producida principalmente por astrocitos, células de la microglía y en menor medida por neuronas. A diferencia del transporte de lípidos en la periferia donde ApoE es un componente estructural de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), en el SNC ApoE forma lipoproteínas de alta densidad (HDL), la única forma de transporte de lípidos en el cerebro, que incluyen esteres de colesterol, triglicéridos y fosfolípidos. El proceso de lipidación de ApoE se da por medio de proteínas transportadoras como ABCA1 y ABCG1 (del inglés ATP binding cassette subfamily A member 1), que se encargan de translocar colesterol y fosfolípidos a las lipoproteínas libres, dando lugar a la generación de HDL (Kim et al., 2009)(N. Zhao, Liu, Qiao, & Bu, 2018). Respecto al nivel de lipidación de las partículas de lipoproteínas conformadas por ApoE4, la evidencia experimental sugiere que éste es mucho menor que el de partículas

de lipoproteínas conformadas por ApoE2 y ApoE3, lo cual se asocia a la reducción de la afinidad de las lipoproteínas por el péptido Aβ y su capacidad de transporte y remoción.

En resumen, las isoformas ApoE2 y ApoE3 producen HDL que presenta mayor afinidad por los lípidos, y por lo tanto mayor efectividad en el transporte cerebral de colesterol con respecto a la isoforma ApoE4, de esta forma se ha asociado la isoforma E4 con mayor presencia de balsas lipídicas, induciendo a un incremento en el procesamiento de APP por la vía amiloidogénica (N. Zhao et al., 2018). En segundo lugar, y retomando una de las formas de remoción del péptido Aβ del tejido cerebral, la afinidad del péptido Aβ por el dominio de unión a lípidos de ApoE crece proporcionalmente al nivel de lipidación de la lipoproteína, lo que implica que la isoforma ApoE4 no tendría la misma capacidad de remoción del péptido Aβ con respecto a las demás isoformas, confiriendo un factor de riesgo para el desarrollo y la progresión de la EA (Simons et al., 2002).

1.3 Receptores nucleares y EA

La superfamilia de receptores nucleares cuenta con 48 miembros conocidos en humanos, caracterizados por su función como factores de transcripción dependientes de ligando, capaces de activar la transcripción génica y controlar procesos biológicos relacionados con proliferación celular, desarrollo, metabolismo y reproducción, entre otros (Sever & Glass, 2013).

Estructuralmente, contienen un dominio amino-terminal que incluye las regiones de transactivación, esencial para dimerización y anclaje de coactivadores independientes de ligando; una región central con el dominio conservado de unión a DNA compuesto por dos dedos de Zinc, una región corta responsable de la localización nuclear (Dominio D) y un extremo carboxi – terminal responsable de la unión a ligando (Dominio E o LBD). La unión al DNA se da por medio del reconocimiento de una secuencia conservada específica denominada elemento de respuesta a hormona (HRE, por sus siglas en inglés) (Sever & Glass, 2013)

1.3.1 Receptores X del Hígado (LXR) y EA

Los receptores X del hígado o LXRα del inglés Liver X Receptors (NR1H3) y LXRβ (NR1H2) pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares clase II y participan en la regulación del metabolismo por medio de la activación o represión transcripcional,

actuando como factores de transcripción regulados por unión de un ligando. Están involucrados en múltiples funciones fisiológicas incluyendo la regulación de las vías metabólicas que controlan el gasto energético, la señalización de insulina, el metabolismo de la glucosa, lípidos y colesterol (Korach-André & Gustafsson, 2015). Las dos isoformas de LXR se expresan diferencialmente en los tejidos; LXRα se expresa principalmente en órganos involucrados con el metabolismo de lípidos como el hígado, el tejido adiposo y los macrófagos, LXRβ se expresa en el sistema inmune, en células de la glía del sistema nervioso central, en los islotes del páncreas, en músculo esquelético y en el epitelio prostático.

El mecanismo de activación de LXR implica la heterodimerización con RXR inducida por ligandos de LXR (oxiesteroles) o RXR (ácido 9-cis-retinoico). Los blancos transcripcionales de LXR son cientos de genes, incluyendo el gen de ApoE y del transportador de colesterol (ABCA1), lo que implica que la activación de LXR puede regular el aumento en la síntesis de ApoE y, por ende, en el metabolismo cerebral del colesterol (Liang et al., 2004). Adicional a la síntesis de estas proteínas, la activación natural de LXR se ha relacionado con incrementos de expresión de ácido graso-sintasa, lipoprotein-lipasa, proteína de transferencia de éster de colesterilo, proteína de unión al elemento regulador del esterol (SREBP-1c) y proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP)

1.3.2 Ligandos de LXR

Los ligandos naturales de LXR comprenden el grupo de derivados oxigenados del colesterol que incluyen 22(R)-hidroxicolesterol, 20(S)-hidroxicolesterol, 24(S)-hidroxicolesterol, 24(S),25-epoxicolesterol, 25-hidroxicolesterol y 27-hidroxicolesterol y otras moléculas derivadas del colesterol como el esterol activado por fluido folicular. En contraste, los antagonistas naturales conocidos para LXR son 5α,6α-epoxicolesterol, 7-cetocolesterol-3-sulfato, ácidos grasos poliinsaturados, Prostaglandina F2α, y ácido ursodeoxicólico (Huang, 2014). Recientemente, se ha evaluado la actividad agonista de sustancias obtenidas de fuentes naturales (plantas y hongos) en la línea celular HEK293, y su efecto activador sobre LXRα. Esta activación es llevada a cabo por diterpenos; esteroides naturales ampliamente distribuidos en plantas e insectos. Con respecto a los agonistas de origen vegetal, se destacan sitosterol y sitostanol, diterpenos, ácido

acantoico, ácido podocárpico, paeoniflorina, cianidina, paxilina con actividad agonista LXRα y LXRβ (Sodhi & Singh, 2013).

Respecto a agonistas sintéticos de LXR, se han estudiado principalmente los efectos de las moléculas T0901317 y GW3965 (Loren, Huang, Laffitte, & Molteni, 2013) las cuales tienen diferencias respecto a la afinidad por LXRα y LXRβ Aunque los dos presentan una EC-50 de unión a LXR de 20nM, el agonista GW3965 presenta una unión preferencial por receptores LXR α y β, mientras que TO901317 también es agonista de receptores FXR y PXR (A. G. et al Sandoval-Hernández, 2016) (Jiang et al., 2008) (Donkin et al., 2010). Sus efectos tienen diferencias, sin embargo en conjunto, estos agonistas incrementan los niveles de expresión de las proteínas ABCA1 y ApoE, en hipocampo y corteza y producen mejoría cognitiva en modelos murinos doble y triple transgénicos de EA (Donkin et al., 2010) (A. G. Sandoval-Hernández, Buitrago, Moreno, Cardona-Gómez, & Arboleda, 2015). Sin embargo, su aplicación clínica en humanos está restringida por los efectos adversos en tratamientos crónicos que incluyen aumento en la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos a partir de la inducción de SREBP1, FAS, SCD1 y otros genes, que determinan la aparición de hipertrigliceridemia y esteatosis hepática. Eventualmente, la administración de agonistas sintéticos también puede reducir la cantidad de neutrófilos circulantes por la reducción de su producción en la médula ósea dependiente de IL23α (Kirchgessner et al., 2016).

1.4 Plasticidad sináptica y EA

La acumulación de péptidos Aβ (placas seniles) y proteína Tau fosforilada (ovillos neurofibrilares) en la corteza frontal y el hipocampo se relaciona con cambios en la dinámica sináptica. Estos cambios fueron inicialmente descritos por Gonatas y colaboradores (Gonatas, NK; Anderson, W; Evangelista, 1967) y actualmente se acepta que la disfunción sináptica se presenta de manera temprana en la EA y guarda una alta correlación con el grado de severidad de la enfermedad. A nivel estructural, se presenta una regulación a la baja de proteínas sinápticas como sinaptofisina, sinaptobrevina, SNAP 25, sinaptotagmina, sintaxina, Rab3a, sinapsina I y proteínas de la densidad postsináptica como PSD-95, Homer e IRSp53 (Wilde et al., 2017), así como también de botones sinápticos en la neocorteza y el hipocampo (Pozueta, Lefort, & Shelanski, 2013).

La pérdida de la integridad sináptica en la EA surge como producto de alteraciones en las cascadas moleculares que se producen por disfunción de la maquinaria de la vesícula sináptica y los receptores de glutamato, progresando a la disfunción mitocondrial, reducción del flujo axónico y pérdida del soporte neurotrófico (Wilde et al., 2017) (Overk, Cassia R; Masliah, 2015). La acumulación del péptido Aβ en los botones sinápticos induce una serie de cascadas de señalización que activan vías como Fyn, CDK5 y GSK3β, que a su vez incrementan la fosforilación de Tau. La interacción de Aβ con la neurona presináptica se da a través de la unión a receptores como efrina (ephR2) y proteína priónica (PrP), luego de lo cual es capaz de activar las vías descritas y ejercer su efecto sinaptotóxico (Overk, Cassia R; Masliah, 2015).

La disfunción sináptica en el estadio intermedio de la enfermedad progresa con la hiperfosforilación de la proteína Tau que se acumula en el espacio intracelular de forma oligomérica, dificultando el transporte de factores neurotróficos y la estabilidad sináptica al impedir el soporte estructural por microtúbulos. La patología progresa al daño mitocondrial que induce estrés oxidativo y asociado pérdida de terminales presinápticos y espinas dendríticas. En el estadío tardío, y teniendo como base el proceso neuro-inflamatorio, se produce una pérdida neuronal selectiva y daño irreversible en el hipocampo y la corteza frontal (Wilde et al., 2017).

Los cambios en la estructura de la función sináptica en EA también se han asociado con el genotipo ApoE. Se ha demostrado una asociación entre el alelo ε4 y la pérdida de proteínas postsinápticas y presinapticas incluyendo: PSD95, Drebrina y sinaptofisina en animales 3xTg-AD y 5xTg FAD. Estos hallazgos se relacionan con el efecto de este genotipo sobre la expresión de receptores NMDA y la activación corriente abajo de factores tróficos vía Elemento de unión a AMP cíclico (cAMP), Elemento de respuesta a cAMP (pCREB) pCREB y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF por sus siglas en inglés) (D. Liu et al., 2015)..

A nivel funcional, las sinapsis pueden formar canales de interacción en red y aumentar su efecto por medio de un mecanismo de plasticidad Hebbiana, que ha sido demostrado en circuitos glutamatérgicos por estimulaciones de alta frecuencia en neuronas presinápticas hipocampales de la vía perforante que logran inducir un aumento de los potenciales excitatorios en las neuronas postsinápticas del giro dentado (Bliss, TVP; Lomo, 1973). El término que define esta propiedad es “Potenciación de Largo Término” (LTP, del inglés

Long-term potentiation) y se ha sugerido como el correlato celular de los procesos de aprendizaje y memoria (Jang & Chung, 2016).

Las alteraciones de la plasticidad sináptica en la EA involucran un daño inicial por el péptido Aβ en su forma soluble y oligomérica, el cual puede inducir una activación excesiva de receptores NMDA en regiones extra-sinápticas que contienen subunidades GluN2B causando inhibición de LTP y facilitación del proceso inverso, conocido como Depresión a largo término (LTD por sus siglas en inglés) desregulando vías de señalización ERK y CREB, principalmente. Estas respuestas se pueden explicar, en parte, por una disminución de la recaptación de glutamato que induce una propagación del mismo a los sitios extra-sinápticos (Li et al., 2011). Lo anterior se relaciona con la activación de vías de muerte celular por defosforilación de ERK e inactivación de la vía CREB (Li et al., 2011) lo que induciría muerte neuronal a través de (caspasas, APAF1, Puma, FOXO, p53) (R. Wang & Reddy, 2017). La sobreactivación de los receptores NMDA también se relaciona con un aumento de la permeabilidad neuronal al calcio, que activa la apoptosis. Este proceso, conocido como excitotoxicidad, es una característica de la EA, diana farmacológica de la memantina, un fármaco aprobado por la FDA antagonista no competitivo de los receptores NMDA.

Los procesos de consolidación de aprendizaje y memoria y los mecanismos de plasticidad sináptica involucrando la LTP puede ser evaluada en modelos animales que sobreexpresens genes implicados en el desarrollo y la progresión de la EA (*APP [Swe], PS1 [M146 V], Tau [P301L]*). El laberinto acuático de Morris (MWM del inglés Morris Water Maze) es un montaje desarrollado para la evaluación de aprendizaje espacial y memoria a corto y mediano plazo dependientes del hipocampo (Innis et al., 1998)(Wolfer & Lipp, 2014). Esta evaluación, además de los experimentos electrofisiológicos, brinda un acercamiento a la función sináptica dependiente del hipocampo en modelos de la EA, así como también permite evaluar el efecto de diferentes candidatos a fármacos.

1.4.1 Espinas dendríticas y EA

Las espinas dendríticas constituyen el elemento estructural responsable de la postsinapsis, y son reconocidas como los receptores principales de entradas sinápticas en las neuronas (Yuste, 2015). La estructura de las espinas dendríticas y su estudio mediante microscopía confocal ha permitido definir los parámetros morfológicos que las caracterizan. En general,

tienen una longitud de 1 – 3 µm y un volumen de 0,01 a 0,8 μm^3, y consisten típicamente de una cabeza redondeada y un "cuello" más delgado que sobresale del eje dendrítico. En cuanto a su morfología, y siguiendo el mismo orden de maduración, se encuentran las espinas delgadas o inmaduras en las que no hay cuello discernible y son relativamente cortas en longitud. Las espinas maduras adquieren una forma pedunculada conteniendo una cabeza que presenta un diámetro mayor al del cuello, denominadas "mushroom" o en forma de hongo. Finalmente, las espinas maduras pueden presentar bifurcaciones o arborizaciones que permiten múltiples entradas excitatorias en una sola espina (Gipson & Olive, 2017).

Las alteraciones en la morfología y función de las espinas dendríticas son características de la EA. Los pacientes en etapas tempranas de la enfermedad presentan reducción de las sinapsis del giro temporal inferior que tiene un rol importante en la fluidez verbal, en la región CA1, el giro dentado, y el giro cingulado posterior; esta alteración sináptica cursa con una marcada reducción de la proteína presináptica sinaptofisina.

Se ha demostrado que las formas oligoméricas (dímeros, trímeros y tetrámeros) del péptido Aβ (oAβ) alteran el funcionamiento de la neurona postsináptica al generar excitotoxicidad vía kinasas de la familia Src como Fyn; este mecanismo implica fosforilación de la subunidad NR2B de los receptores de glutamato, incrementa su activación, acompañado de la entrada masiva de calcio a la neurona. Adicionalmente, el daño postsináptico puede ocurrir por los efectos deletéreos de la inflamación, ejemplo de ello es la liberación de interleucina-1β, que puede antagonizar la acción de factores neurotróficos como BDNF y producir muerte neuronal. El proceso inflamatorio puede resultar aún más dañino para la espina dendrítica al aumentar la actividad de caspasas como consecuencia de la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Amelio et al., 2010)(Y. Wang & Sheng, 2014).

La hiperfosforilación de la proteína Tau también se ha asociado con la pérdida de espinas dendríticas debido a su capacidad para aumentar la inmunoreactividad para interleucina 1β y ciclooxigenasa 2, capaces de activar la microglía (Bellucci et al., 2004).

En estudios recientes del grupo de Investigación en Muerte Celular se ha estudiado el efecto tóxico de oligómeros de Aβ (oAβ) sobre la dinámica sináptica en cultivo primario de neuronas hipocampales en términos de la densidad de espinas dendríticas (disminución

de espinas tipo mushroom o maduras), disminución del número de contactos sinápticos, y desregulación de la expresión de proteínas presinápticas (SYT1 SV2A) y postsinápticas (Shank2, PSD95, GluR2B, GluA2). La administración de un agonista sintético de LXR (GW3965) en presencia de oAβ restaura o previene los cambios asociados a la toxicidad del péptido Aβ en virtud de su efecto sobre la modulación transcripcional de proteínas como ApoE, ABCA1, PINK1 y probablemente algunas proteínas presinápticas como sinaptofisina y sinapsina1 (Beez-Becerra, Filipello, Sandoval, Arboleda, & Arboleda, 2018).

1.5 Alteraciones en la mielinización y EA

Aunque clásicamente las alteraciones descritas en la EA se refieren a la neurodegeneración en la sustancia gris del hipocampo y la corteza cerebral; la sustancia blanca y los axones mielinizados también presentan alteraciones relacionadas con la disfunción de oligodendrocitos, células encargadas de brindar soporte a las neuronas en términos de reconocimiento de axones, diferenciación terminal, envoltura del axón y producción y mantenimiento de mielina (Cai & Xiao, 2016).

Los oligodendrocitos son conocidos como células gliales encargadas de la mielinización en el Sistema Nervioso Central. Este proceso, encargado de aislar los axones y regular la transmisión de las señales eléctricas, exige de esta célula una alta tasa de recambio metabólico, siendo capaz de producir tres veces su peso en mielina y hasta tres veces su peso en membranas de soporte por día, lo cual determina su vulnerabilidad ante la activación de múltiples vías de daño y muerte por agentes externos o tóxicos (Barateiro & Fernandes, 2014).

La progresión del linaje de la oligodendroglía ocurre de una manera muy regulada a través de un programa de migración, proliferación, diferenciación y mielinización claramente identificables de acuerdo con la capacidad de proliferación y migración, y también con la expresión de marcadores moleculares. De esta forma, se reconocen cuatro etapas de maduración: a) Células precursoras de Oligodendrocitos (OPC, del inglés oligodendrocyte precursor cells) que presentan alta capacidad migratoria y la expresión del receptor α del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-Rα), el gangliósido A2B5 y el proteoglicano NG2; b) preoligodendrocitos (o células OPC tardías) que extienden múltiples prolongaciones pequeñas y expresan marcadores de OPC así como también sulfatide reconocido por el anticuerpo O4; c) oligodendrocitos inmaduros (o premielinizantes) que

siguen siendo reactivos para el anticuerpo O4 y empiezan a expresar galactocerebrósido C, convirtiéndose en células postmitóticas con grandes prolongaciones pertenecientes al linaje de la oligodendroglía, y finalmente d) oligodendrocitos maduros (o mielinizantes), células funcionales que extienden membranas de mielina alrededor de los axones y expresan proteínas relacionadas con esta función (Proteína Básica de Mielina, proteína proteolipídica, glicoproteína asociada a mielina y glicoproteína de oligodendrocitos) (Barateiro & Fernandes, 2014).

El mecanismo por el cual el péptido Aβ altera la fisiología de los oligodendrocitos implicaría en primer lugar la susceptibilidad de este linaje debido a su bajo contenido de defensa antioxidante, produciendo la reducción del Glutatión e incrementando la concentración de hierro, lo que reduce la eliminación de peróxidos. Sumado a lo anterior, el péptido Aβ, conocido por su actividad neurotóxica, sería capaz de ingresar al oligodendrocito y generar muerte celular por aumento de la actividad de la esfingomielinasa neutra, cuyo producto neurotóxico, la ceramida, activaría procesos de apoptosis (J. Lee et al., 2004).

La disfunción de los oligodendrocitos en la EA implica principalmente el déficit en la producción y reparación de mielina en las áreas más afectadas por la desmielinización en la EA que coinciden con procesos de mielinización tardía durante el desarrollo, a saber; los lóbulos temporal y frontal (Stricker et al., 2009). La pérdida de mielina en estas regiones libera hierro, que promueve el desarrollo de la patología amiloide al aumentar la capacidad de agregación de oligómeros Aβ (Bartzokis, George; Lu, Po H; Mintzd, 2008), lo que contribuye a generar un ciclo de desmielinización focalizado en estas regiones (S. Wang et al., 2018).

Por otra parte, aun no es claro el papel de los péptidos Aβ en la fisiopatología de la enfermedad, recientemente se evidencio que el péptido Aβ es capaz de inducir la expresión de marcadores de maduración de oligodendrocitos como Proteína Básica de Mielina (MBP, por sus siglas en inglés), específicamente la isoforma de 18.5 kDa. Para modular la expresión de MBP a nivel traduccional, el péptido Aβ en su interacción con el oligodendrocito requeriría la actividad de kinasas de la familia Fyn y receptores de integrina β1. La expresión de MBP estaría restringida en este contexto a las regiones más distales de la célula (Quintela-lópez et al., 2019).

La neurodegeneración de la sustancia blanca se ha reportado en etapas muy tempranas de la EA en humanos, en un patrón radiológico conocido como hiperintensidad de sustancia blanca, localizado en regiones con baja perfusión, particularmente la sustancia blanca periventricular, dada la disminución de la densidad de vasos sanguíneos con el envejecimiento. Histopatológicamente, las hiperintensidades de sustancia blanca se han asociado con pérdida de mielina, pérdida de axones mielinizados y cambios en la adventicia arterial en la profundidad de la sustancia blanca donde ocurre la perfusión (S. Lee et al., 2017)(Nasrabady, Rizvi, Goldman, & Brickman, 2018). Este hallazgo radiológico guarda alta correlación con los niveles de $A\beta_{1-42}$ en líquido cefalorraquídeo en EA preclínica (S. Lee et al., 2017), y también se asocia con niveles de Tau en líquido cefalorraquídeo de pacientes con deterioro cognitivo leve (Tosto, G; Zimmerman, M.E; Hamilton, J.L; Carmichel, O.T; Brickman, 2016).

1.6 Neurogénesis adulta

La neurogénesis se define como el proceso de generación de nuevas neuronas desde precursores. Se encuentra espacialmente restringido a dos regiones en el cerebro: la zona subgranular en el giro dentado del hipocampo (SGZ), donde las nuevas neuronas excitatorias ubicadas en el giro dentado juegan un papel importante en el aprendizaje y la memoria; y la zona subventricular de los ventrículos laterales (SVZ), donde los progenitores primarios generan nuevas neuronas que migran una larga distancia (3 a 8 mm en ratón) hacia el bulbo olfatorio. Allí contribuyen a la discriminación olfatoria fina y la asociación olor-recompensa (Ming & Song, 2011; Obernier & Alvarez-buylla, 2019).

En la SVZ del giro dentado, las células madre neuronales presentan una morfología glial radial y expresan principalmente los marcadores GFAP y nestina. En el proceso de generación de precursores no radiales, las células madre dan lugar a la formación de neuroblastos que modifican la expresión de proteínas y permiten la identificación de los marcadores Doblecotrina (DCX) y Dlx2, lo cual les confiere la capacidad de migración a través del canal migratorio rostral formado por astrocitos hacia la capa granular del giro dentado y progresivamente proyectan axones a través del Hilus hacia la región CA3 (C. Zhao, Teng, Jr, Ming, & Gage, 2006). Con respecto a su actividad electrofisiológica, las nuevas neuronas presentan un proceso de integración sináptica que incluye la activación tónica GABAérgica desde las interneuronas locales, luego de lo cual empiezan a recibir inputs GABAérgicos, y finalmente inputs glutamatérgicos (Espo et al., 2005). En estas

últimas etapas de diferenciación y maduración, las nuevas neuronas expresan marcadores como NeuN, Calretinina en la diferenciación temprana, y Calbindina en la diferenciación tardía (Ming & Song, 2011)(Obernier & Alvarez-buylla, 2019).

En un estudio reciente en seres humanos (Moreno-Jiménez et al., 2019), respecto del proceso de neurogénesis en pacientes con EA y controles sanos en diferentes estadíos según la estratificación Braak, que clasifica su progresión de acuerdo al compromiso de la patología Tau. El estudio concluye que la neurogénesis es un proceso activo durante el ciclo vital, y que se encuentra alterado en la EA en una relación directa con el nivel de progresión de la patología. Durante la evaluación de los mecanismos moleculares de la neurogénesis, se observó que el proceso de maduración tardía de los precursores neuronales en el que se expresan los marcadores Calretinina y Calbindina, revela una deficiencia en la expresión del marcador de maduración tardía Calbindina. Teniendo en cuenta que la neurogénesis en la SVZ se encuentra alterada desde estadíos tempranos de la EA, su potencial modulación surge como un potencial blanco terapéutico.

1.7 Rol de la vía de señalización fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en EA

La vía PI3K/AKT es conocida por su importante papel en la supervivencia, crecimiento, proliferación y migración celular (Hoxhaj, Gerta, Brendan D, 2019). La vía de señalización es activada por factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), insulina y calmodulina a través de su interacción con receptores tirosina kinasa en la membrana celular, que a su vez activan la fosforilación de fosfatidilinositol (PI) (3,4) bifosfato (PIP2) a PI (3,4,5) trifosfato (PIP3). Esta activación por fosforilación conduce a la fosforilación del principal blanco de la vía, la proteína kinasa B, también conocida como AKT. La fosforilación y activación de AKT afecta por lo menos cien sustratos diferentes que son importantes en la señalización celular. De manera particular se puede señalar a GSK-3β como una de las kinasas con mayor actividad en la fosforilación de la proteína tau. AKT activada es capaz de fosforilar GSK-3β en serina 9 induciendo su inactivación (Xu, F., Na, L., Li, Y., & Chen, 2020). Otro de los blancos de PI3K/AKT es la activación del complejo mTOR, que funciona como una serina/treonina kinasa regulando los procesos de crecimiento, proliferación, motilidad, supervivencia, síntesis de proteínas, autofagia y activación de la transcripción. En

particular, la activación del complejo mTORc1 (mTOR, Raptor, GβL y DEPTOR) es el responsable de la supervivencia celular. Se ha reportado la disfunción de esta vía de señalización en enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Parkinson (Arboleda G., Cardenas Y., Rodriguez Y., Morales L.C., Matheus L., 2010) y en la EA (Oddo, 2012). A este respecto la evidencia es controversial, pues la activación crónica de mTOR por amiloide beta en los primeros estadios de la EA puede incrementar la patología tau al incrementar su traducción, aunque otros reportes sugieren que grandes concentraciones de amiloide beta pueden atenuar esta sobre activación. Sin embargo, se han estudiado alternativas terapéuticas a partir de la activación de la vía PI3K/AKT por su acción cascada abajo sobre la inhibición de GSK-3β (Jung Yu, Hyun- & Koh, 2017).

1.8 Alternativas Terapéuticas

Históricamente las terapias para el tratamiento de la EA se han desarrollado tomando como base las hipótesis que postulan los mecanismos de la etiopatogenia, teniendo en cuenta que la hipótesis amiloide es la más aceptada por la comunidad científica se han desarrollado cuatro estrategias principales: prevención o reducción de la formación de Aβ dirigido a enzimas proteolíticas que regulan el procesamiento de APP, desde esta alternativa se han desarrollado inhibidores de γ-secretasa e inhibidores de β-secretasa, otras alternativas incluyen la remoción de los péptidos Aβ a través de inmunoterapia (inmunización activa o pasiva), prevención o reducción de la agregación de Aβ, y aumento de los mecanismos de remoción del péptido Aβ (Giacobini & Gold, 2013). De la misma manera, el abordaje terapéutico desde la hipótesis de la patología tau, incluye los inhibidores de la agregación de tau, inhibidores de kinasas implicadas en la fosforilación de tau (principalmente GSK-3 β), e inmunoterapia activa y pasiva (Massoud & Gauthier, 2010).

La farmacoterapia convencional para el tratamiento de la EA se relaciona con dos mecanismos implicados en la progresión y el desarrollo de la enfermedad; la hipótesis colinérgica y la glutamatérgica. A nivel de la modulación colinérgica, los fármacos inhibidores de acetilcolinesterasas donepezil y rivastigmina aumentan la disponibilidad de acetilcolina en el cerebro de pacientes con EA al inhibir farmacológicamente y de forma dosis-dependiente la actividad de la enzima encargada de su degradación metabólica, la acetilcolinesterasa. Con respecto a las alteraciones relacionadas con la excitotoxicidad por

sobreactivación de receptores NMDA y entrada masiva de calcio a la neurona, los antagonistas no competitivos de los receptores NMDA contrarrestan los efectos deletéreos de los altos niveles de glutamato en el cerebro, mejorando únicamente de manera sintomática la situación clínica de los pacientes con EA. A este nivel la FDA solo ha autorizado el uso de memantina (Anand, Patience, Sharma, & Khurana, 2017).

Recientemente se han desarrollado alternativas terapéuticas enfocadas en una alteración común a todos los casos de EA: el metabolismo cerebral del colesterol. Teniendo como base el genotipo del transportador de lípidos ApoE, uno de los principales factores de riesgo genético para el desarrollo de LOAD, se ha buscado dilucidar el mecanismo de remoción del péptido Aβ vía transporte por lipoproteínas. Al respecto, se ha procurado la búsqueda de agonistas de receptores nucleares implicados en la modulación de la expresión génica de ApoE y el transportador ABCA1, implicado en la lipidación de ApoE y por tanto en la formación de partículas de lipoproteínas capaces de transportar péptidos Aβ fuera del tejido cerebral.

Recientemente, en nuestro grupo de investigación se ha evaluado el efecto de agonistas sintéticos de LXR (GW3965) y de RXR (Bexaroteno) sobre la fisiopatología de EA y se reportó un incremento en la proliferación de precursores neurales en la capa subgranular del giro dentado del hipocampo, así como también un rescate de los déficits en LTP inducidos por Aβ en una manera dependiente de la síntesis de proteínas (A. G. Sandoval-Hernández et al., 2015). En otro estudio de nuestro grupo se comprobó el efecto de la administración de GW3965 en el desempeño de ratones 3xTg-AD en pruebas cognitivas como Morris Water Maze y una reducción de la metilación del DNA en el hipocampo, en genes relacionados con la función sináptica y la neurogénesis (A. G. Sandoval-Hernández et al., 2015).

1.8.1 Productos Naturales Vegetales como candidatos a fármacos para EA

Las plantas medicinales han sido estudiadas para el tratamiento de EA y se ha evaluado su efectividad en ensayos preclínicos. El descubrimiento del potencial efecto benéfico para EA de estas plantas ha sido posible gracias a los enfoques de la etnobotánica y la fitoquímica, cuyo papel ha sido fundamental en las aproximaciones de las medicinas China y Europea.

En el contexto de la medicina occidental, los estudios realizados sugieren que el uso de plantas medicinales tiene potencial actividad anti-oxidante, anti-inflamatoria, estrogénica e inhibidora de butiril y acetilcolinesterasas (Kennedy & Scholey, 2006). La medicina oriental ha descubierto potenciales efectos pro-cognitivos y anti-demencia por su acción neuroprotectora en vías de señalización relacionadas con el plegamiento de proteínas y la neuroinflamación (Essa, Vijayan, Braidy, Guillemin, & Berry, 2012)(Dey et al., 2017).

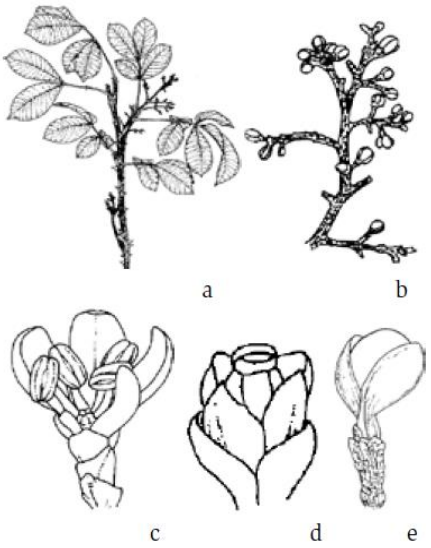
En Colombia, el uso medicinal de las plantas en medicina folclórica ha permitido identificar especies promisorias para diferentes usos (antibacteriano, analgésico, antiespasmódico, antiinflamatorio, diurético, etc.). En la Universidad Nacional, el grupo de investigación en Química de Productos Naturales Vegetales Bioactivos (QuiProNaB) ha identificado que la familia *Rutaceae* presenta diferentes géneros distribuidos por todo el país y, particularmente, el género *Zanthoxylum* ha evidenciado actividad biológica a nivel antimicrobial, citotóxico, antiagregante plaquetario y antitumoral (Macías, Cuca, & Jiménez, 2007). Aunque no se ha relacionado puntualmente la estructura de los componentes del extracto con la actividad biológica, los estudios quimiotaxonómicos sugieren que en el género se presentan metabolitos comunes que permiten dar sentido a la variedad de condiciones de uso de las diferentes especies del género en medicina tradicional.

A partir de los estudios fitoquímicos del género *Zanthoxylum*, se ha identificado la presencia de metabolitos secundarios que permiten el descubrimiento de potenciales usos terapéuticos, entre ellos se pueden distinguir alcaloides, lignanos, amidas, cumarinas, terpenos, flavonoides, y en menor medida, esteroles y cromonas (Cuca & Taborda, 2007). Adicionalmente, en el género destaca la presencia de alcaloides isoquinolìnicos, relacionados con actividad antimicrobiana y antitumoral en células sinoviales de rata (Yang et al., 2014). En estudios recientes del grupo de investigación en Química de Productos Naturales Vegetales Bioactivos (QuiProNaB), las especies del género *Zanthoxylum* se reconocen como una fuente promisoria de alcaloides entre los que se destacan los benzofenantridínicos (Patiño, Angelica, Lozano, Lesmes, & Cuca, 2011).

Dada la amplia distribución del género *Zanthoxylum caribaeum* en el territorio colombiano (Departamentos Atlántico, Amazonas, Boyacá, Bolívar, Cauca, Chocó, Caldas, Córdoba, Cundinamarca, Guajira, Huila, Magdalena, Nariño, Norte de Santander, Putumayo, Quindío, Risaralda, San Andrés y Providencia, Tolima, Valle y Vaupés), se hace necesario

evaluar la actividad biológica de los diferentes extractos (hojas, tallo, raíces, flor) en enfermedades neurodegenerativas, teniendo en cuenta la aprobación del uso de alcaloides como posibles agentes neuroprotectores en el caso particular de EA (Ng, Or, & Ip, 2015). Se ha destacado la acción de alcaloides como agonistas de receptores muscarínicos, antioxidantes, anti amiloidogénicos, inhibidores de acetil y butiril - colinesterasas, y antagonista de receptores NMDA (Hussain et al., 2018).

Figura 1-2 Morfología de *Zanthoxylum caribaeum*. (a). Hábito. **(b)** Inflorescencia. **(c)**. Flor masculina evidenciando estambres y pistilo. d. Gineceo e. Folículo abierto.



Fuente: (Macías et al., 2007)

El uso de extractos vegetales para la evaluación de cambios patológicos en EA es novedoso, y por lo tanto requiere previamente un estudio fitoquímico, quimiotaxonómico, y de actividad biológica en líneas celulares neuronales, así como también en cultivos primarios de neuronas hipocampales sometidas a una carga previa de Aβ. Estos estudios se encuentran actualmente validados por el grupo de investigación en Muerte Celular del Instituto de Genética – Universidad Nacional. La selección de la dosis del extracto crudo debe estar acorde a los lineamientos para la administración oral de medicamentos a modelos animales de experimentación, de 20 mg/kg (Turner, Brabb, Pekow, & Vasbinder, 2011).

Zanthoxylium caribaeum es una especie arbórea perteneciente a la familia *Rutaceae*- El género *Zanthoxylum* abarca alrededor de 549 especies distribuidas principalmente en las regiones tropicales. Este género incluye árboles y arbustos generalmente dioicos que por lo general alcanzan 20 m de altura. Las hojas son variadas, pueden ser alternas u opuestas, simples o compuestas con hasta 15 pares de foliolos. Las flores son actinomorfas, hermafroditas y unisexuales, generalmente blancas o verdes (Silva & Paoli, 2000). El género presenta gran importancia debido a su etnobotánica, fitoquímica y actividad biológica, siendo una fuente promisoria de varios metabolitos secundarios que incluyen alcaloides benzofenantrídicos (Javier Patino, Angelica Prieto, & Enrique Cuc, 2012).

De acuerdo a los reportes etnobotánicos, los usos del género *Zanthoxylum* se relacionan con propiedades atribuidas al tratamiento de la malaria, desórdenes gastrointestinales, enfermedades pulmonares, acción emenagoga, antihelmíntica, antihemorrágica, anti convulsivante, diurética, tónica y estimulante (Javier Patino et al., 2012).

Estudios fitoquímicos realizados en las especies del género *Zanthoxylum* relacionan la presencia de alcaloides, lignanos, cumarinas y amidas como marcadores quimiotaxonómicos del género, aunque también se han reportado contenidos de flavonoides, esteroles y terpenos (Patiño, 2004)(Adesina, 2005).

Por su riqueza en moléculas bioactivas, especialmente en alcaloides isoquinolínicos como la berberina, que ha sido identificada como potencial anticolinérgico, inhibidor de la monoamino oxidasa (MAO), antiagregante de Aβ y regulador del colesterol (Plazas, Erika, R, Avila, Batista, Costa, & Luis, 2019), el extracto de *Zanthoxylum caribaeum* representa un agente promisorio para el tratamiento de la EA. En tesis de posgrado se ha investigado su potencial actividad agonista de receptores LXR (Valencia, 2017), así como también su actividad antioxidante, inhibidor de acetilcolinesterasas, anti-agregante de Aβ (Bustamante, 2021) y neuroprotector frente a diferentes neurotoxinas (Bustos, 2021) en tesis de maestría en curso.

1.8.2 Modelo animal triple transgénico de EA

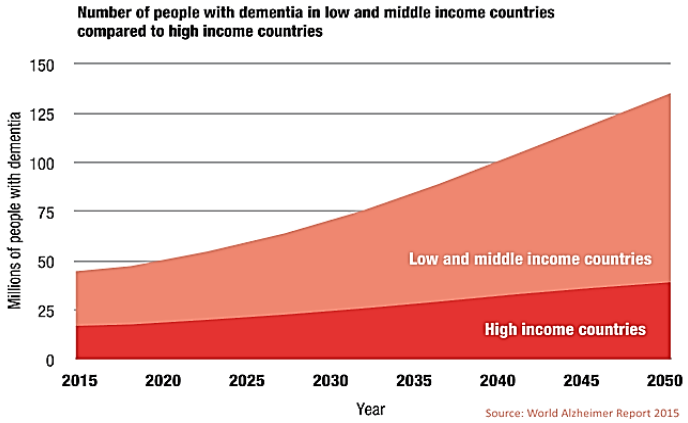
El modelo triple-transgénico de la Enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD) desarrollado por Oddo (Oddo et al., 2003), presenta el *knock-in* de los transgenes PS1M146V, APPSwe y tauP301L. Los transgenes se encuentran integrados en un locus bajo el control del

promotor Thy1.2, que restringe su expresión al SNC. Esta cepa presenta depósitos del péptido Aβ de forma temprana a los 6 meses de edad en corteza frontal que progresa a las capas 4 y 5 con la edad. La acumulación de ovillos neurofibrilares se puede observar a los 12 meses en las neuronas de la región CA1 del hipocampo. Esta cepa presenta astrogliosis demostrada por aumento de la inmunorreactividad de la proteína GFAP e Iba-1 evidencia de astrogliosis y microgliosis a los 7 meses de edad, alteraciones en la LTP hacia los seis meses de edad (37). En estudios recientes se ha caracterizado la evolución neuroanatómica y neurofisiológica de la patología en el modelo 3xTg-AD, demostrando que el modelo presenta deficiencias detectables en memoria espacial evaluadas por el Laberinto Acuático de Morris (MWM del ingles Morris Water Maze) a las 24 semanas de edad. A nivel estructural, el modelo presenta reducción del volumen hipocampal total. sin embargo, la región CA1 del hipocampo presenta una reducción de su volumen con respecto a otras áreas; la corteza entorrinal presenta una tasa de descenso volumétrico (volumen y grosor) asociada con la reducción de la memoria y deterioro cognitivo, con una mayor afectación de la porción medial relacionada con memoria espacial y contextual. De la misma forma, se presentan reducciones volumétricas más tardías en bulbo olfatorio, corteza piriforme y cerebelo (Kong et al., 2018).

2. Justificación

Teniendo en cuenta que la EA es la causa más común de demencia a nivel mundial, representando entre el 60 y el 80% del total de los casos (A. Association, 2018). Que su presentación clínica es compleja afectando no solo al paciente sino también su entorno, evidenciando alteraciones en la memoria, depresión, perdida de habilidades comunicativas, desorientación, confusión, pérdida del juicio, hacia un estadio final con dependencia total para las actividades de la vida cotidiana. Desde el punto de vista epidemiológico de la enfermedad, en el año 2015 se reportaron 46 millones de casos en todo el mundo y se estimó que la cifra se duplicará cada 20 años, con un estimado de 131,5 millones de casos para el 2050 (**Figura 2-1**) (Alzheimer's Disease International, 2015), generando costos aproximados de 818 billones de dólares a los sistemas de salud a nivel mundial en 2015, divididos en costos médicos directos y gastos sociales. (A. Association, 2018). Sin embargo, a pesar de estos indicadores y que a pesar de que la descripción del primer caso se dio desde 1906, las terapias usadas hasta el momento son paliativas y no modifican los mecanismos etiológicos, y terminan ocasionando mayores costos a los sistemas de salud.

Figura 2-1 Estimación del comportamiento de la EA hasta el año 2050, discriminado por territorios con altos y bajos ingresos económicos, resaltando el aumento de la prevalencia en países del tercer mundo.



Obtenido de (Alzheimer's Disease International, 2015).

En el contexto colombiano, los reportes para la EA se encuentran bajo el grueso del grupo de demencias según el Boletín de Salud Mental – Demencia generado por el Ministerio de Salud y Protección Social. Según este boletín, se han atendido en total 252,577 casos en el periodo comprendido entre 2009 y 2015 según los registros individuales de prestación de servicios (RIPS). Adicionalmente, el boletín reporta una prevalencia de demencia del 9,4 % que aumentó con la edad. En hombres la prevalencia fue de 8,1 % y en mujeres de 10,7 % (Ministerio de Salud y Protección Social, 2017). Aunque se cuenta con un estimado de la prevalencia de las demencias en el país, la carga económica y social no ha sido calculada. Sin embargo, se sabe que los gastos para los países en vías de desarrollo producirán mayores problemas para sus sistemas de salud teniendo en cuenta los bajos ingresos per cápita en estas regiones, lo que incluye a Colombia.

Teniendo en cuenta estos datos, es relevante para la salud pública del país la contribución realizar investigación en todos los frentes respecto a la EA, desde el punto de vista epidemiológico, genético y también en la búsqueda de posibles agentes terapéuticos capaces de atacar múltiples blancos moleculares activos en la EA, y contribuir de esta forma a la elucidación de posibles mecanismos de reducción de la carga amiloide y mejoría cognitiva que permita disminuir los costos de la enfermedad y aproximar la investigación farmacológica actual a terapéuticas multimodales capaces de atacar varios blancos

moleculares. En ese sentido, los productos naturales vegetales son uno de los recursos más prometedores, que presentan características farmacológicas multimodales para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas en virtud de su enorme diversidad estructural en la interacción química como en la funcionalidad biológica por las enzimas involucradas en sus rutas biosintéticas, lo que permite pre-validar las características necesarias para su interacción con biomoléculas (Plazas, Erika; Casoti, Rosana; Ávila, Mónica; Batista-DaCosta, Fernando; Cuca, 2019) (Hattum, H; Waldmann, 2014). El extracto etanólico de *Z. caribaeum* se presenta como una alternativa promisoria debido a su riqueza fitoquímica, pero particularmente por la presencia de alcaloides que se relacionan con alto impacto en el desarrollo de fármacos contra la EA. En este grupo, los alcaloides benzofenantrídicos como las protoberberinas las benzofenantridinas y las aporfinas se han caracterizado por su potencial de acción multimodal dada su acción sobre diferentes blancos moleculares involucrados en el desarrollo de la EA. El modelo animal 3xTg-AD ofrece una plataforma de investigación que permite estudiar el efecto del extracto sobre los principales marcadores fisiopatológicos de la EA y pre validar sus efectos biológicos sobre las cascadas patogénicas de la enfermedad.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de un extracto etanólico de *Zanthoxylum caribaeum* en el modelo animal triple transgénico de la Enfermedad de Alzheimer.

3.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto del extracto sobre cambios cognitivos en el modelo murino 3xTg-AD.
- Evaluar el efecto del extracto sobre marcadores histopatológicos de EA en el modelo murino de EA.
- Evaluar el efecto del extracto en la expresión de ApoE y ABCA1 en el modelo murino 3xTg-AD.
- Evaluar el efecto del extracto en la expresión de proteínas relacionadas con la función sináptica en animales 3xTg-AD.
- Evaluar el efecto del extracto sobre la activación de la vía PI3K/Akt en modelo murino 3xTg-AD.

4. Materiales y Métodos

4.1 Modelo animal

Se utilizó el modelo triple transgénico de EA (3xTg-AD). En Colombia, la cepa está disponible para reproducción endogámica en condiciones microbiológicamente controladas en la Sede de Investigación Universitaria (SIU) de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Los ratones fueron manejados en el Bioterio del Instituto de Genética de la Universidad Nacional Sede Bogotá, donde fueron mantenidos en un microaislador SuperMouse 750, en un promedio de 3 ratones por caja. Con respecto a las condiciones ambientales, fueron sometidos a un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad y se brindó alimentación *ad libitum*.

Se realizó tratamiento con extracto etanólico de raíz de *Zanthoxylum caribaeum* y se distribuyeron los controles de animales 3xTg-AD y WT-Littermates con vehículo en tres grupos de la siguiente forma: **Tratamiento con *Zanthoxylum caribaeum:*** se usaron 6 animales 3xTg-AD de 12 meses de edad. La dosis del extracto fue de 25 mg/kg/día administrados por *gavage* durante 18 semanas consecutivas. **Controles con administración de vehículo:** se usaron 6 animales 3xTg-AD y 6 animales WT-Littermates con administración de vehículo (agua+tween20 0,5%) vía oral por *gavage* como se indica en la Tabla 4-1.

Para realizar análisis de la expresión de proteínas por Western Blot, se incluyó otra cohorte de animales de doce meses de edad distribuidos en los mismos grupos experimentales (WT-Veh, 3xTg-AD-Veh, 3xTg-AD *Zc*) como se indica en la tabla 4-2

4.2 Diseño experimental

Se usaron 18 animales, distribuidos en grupos de acuerdo con la información de la **Tabla 4-1**

Tabla 4-1 Diseño experimental administración de tratamientos en animales 3xTg-AD de doce meses de edad para inmunofluorescencia.

WT (Littermates)	**3xTg-AD**		**Tiempo de tratamiento (semanas)**
Vehículo (Agua + Tween 20 0,5%)	Extracto *Z caribaeum* 25 mg/kg/día	Vehículo (Agua + Tween 20 0,5%)	18
n=6	n=6	n=6	

Para el análisis de proteínas, se realizó un tratamiento con dosis de 50 mg/kg/día en animales 3xTg-AD.

Tabla 4-2 Diseño experimental administración de tratamientos en animales 3xTg-AD para análisis de proteína por Western Blot

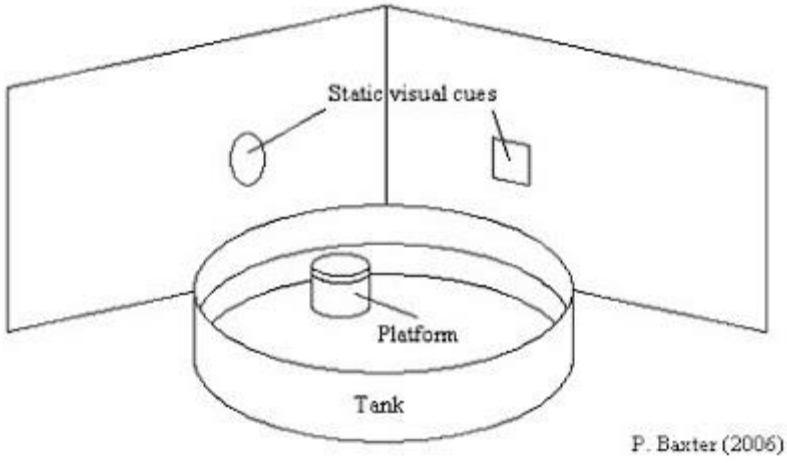
WT (Littermates)	**3xTg-AD**		**Tiempo de tratamiento (semanas)**
Vehículo (Agua + Tween 20 0,5%)	Extracto *Z caribaeum* 50 mg/kg/día	Vehículo (Agua + Tween 20 0,5%)	12
n=4	n=4	n=4	

4.3 Laberinto Acuático de Morris

Se usó el Laberinto acuático de Morris (ver **Figura 4-1**) que evalúa la memoria espacial dependiente del hipocampo (R. G. M. Morris, P. Garrud, 1982). El montaje consiste en una piscina circular de acrílico blanco de 1 m de diámetro y 60 cm de profundidad de acrílico blanco. La plataforma se llena de hasta una altura de 46 cm, la cual es blanqueada con vinilo blanco no tóxico. Sobre una ubicación establecida anteriormente en el laberinto se fija una plataforma cilíndrica de 45 cm de alto por 10 cm de diámetro. Se ubicaron claves visuales en las paredes del laboratorio de comportamiento las cuales fueron permanentes

durante todo el experimento. El desarrollo de la prueba tiene tres etapas en orden cronológico: **1) Prueba de Aprendizaje**, cuyo objetivo es evaluar la capacidad del animal para encontrar la plataforma en intentos de 60 s de duración. Consta de 10 ensayos realizados dos veces al día durante 5 días mañana y tarde, con mínimo 3 horas de diferencia. En cada ensayo se realizan cuatro intentos desde las diferentes posiciones cardinales de partida del ratón en el laberinto, el orden de los intentos varía entre los distintos ensayos. **2) Prueba de retención**: Se realiza sin la plataforma y tiene una duración de 90 segundos. El animal es liberado observando a pared de la plataforma en el sitio opuesto a la ubicación anterior de la plataforma y se evalúa el tiempo de permanencia en las áreas cercanas al perímetro delimitado por la plataforma según cuadrantes. Esta prueba se realiza transcurridas 48 horas desde el último intento en la prueba de aprendizaje. **3) Prueba visible:** se realizó después de la prueba de retención, y su objetivo es descartar posibles variables asociadas al desempeño viso-motor. Se ubica la plataforma visible y se cronometra el tiempo de llegada a la plataforma. El análisis de las pruebas de aprendizaje espacial se realizó con el complemento Animal Tracker del software Fiji (**http://fiji.sc/wiki/index.php/Fiji**). Para el análisis del perfil comportamental se siguió la referencia de Jeugd y cols (Jeugd et al., 2018).

Figura 4-1 Esquema representativo del diseño de la prueba comportamental



4.4 Inmunofluorescencia

Posterior a la finalización de la prueba de comportamiento, todos los animales fueron sacrificados, inicialmente los animales fueron anestesiados mediante solución de

ketamina/xilacina (ketamina 90 mg/kg xilacina 10 mg/kg). Comprobado estado de anestesia se realizó incisión sobre la línea media anterior en tórax y abdomen, se localizó el corazón y se realizó perfusión inicial con jeringa sobre ventrículo izquierdo con solución de Buffer fosfato al 4% para realizar exanguinación y posteriormente se realizó perfusión miocárdica con solución de paraformaldehído 4% en buffer fosfato (PB) para realizar fijación de todos los tejidos aprovechando la continuidad del sistema circulatorio. Se comprobaron los signos de perfusión en extremidades y cola como criterio de punto final. Se realizó la extracción de los cerebros, los cuales inicialmente fueron sumergidos en solución PFA 4% durante 2 días, posteriormente fueron sometidos a un proceso de deshidratación en gradiente de sucrosa en PB hasta 30% y mantenidos en medio de criopreservación a -20°C hasta su procesamiento. Para realizar las inmunofluorescencias, los cerebros fueron cortados en rodajas de 50µm de espesor con vibratomo (Vibrotome 1000 plus, Estados Unidos, California) y almacenados en cajas de 24 pozos en medio de criopreservación luego de pasar por un proceso de deshidratación con gradiente de sucrosa.

Para realizar la inmunofluorescencia se hizo selección de los cortes apropiados según la región del hipocampo que se quiere visualizar, se realizaron lavados sucesivos de los cortes con solución TBS, luego de lo cual se permeabilizó el tejido con solución 1% BSA 0,3% Triton X-100, 0,05% Tween 20 en PBS 0,1mM durante 1 hora, posteriormente se incuba el tejido con los anticuerpos primarios durante 36 horas a 4°C en agitación. Pasado este tiempo se realizaron lavados sucesivos con solución TTBS 1X, y se incubó durante 2 horas con anticuerpos secundarios. Finalizado el periodo de incubación se agregó solución DAPI (Santa Cruz Biotechnology sc-3598) 2:1000 en solución TBS protegido de la luz. Finalmente se realizaron 5 lavados consecutivos con solución TTBS, se extendieron los tejidos sobre láminas portaobjetos gelatinizadas con gelatina proveniente de cerdo, y se cubrieron con medio de montaje gelatina/glicerol. Los anticuerpos utilizados para inmunofluorescencias se encuentran en la **Tabla 4-2**:

Tabla 4-2 Anticuerpos primarios usados para inmunofluorescencias de cortes de tejido criopreservados

Anticuerpo	Marca	Referencia	Dilución
Amiloide beta 6E10	BioLegend	SIG-39320	1:1000
Fosfo-tau (AT8)	ThermoFisher	MN1020	1:500
GFAP	Abcam	ab6260	1:1000
Iba-1	Abcam	ab178847	1:1000
MBP	Abcam	ab62631	1:500
Fosfo-Histona 3 s10 (pHH3s10)	Abcam	ab47297	1:1000
Olig2	Abcam	ab109186	1:500
Nestina	Santa Cruz	SC-21249	1:500
ApoE	Abcam	ab183596	1:500
Sinapsina	Santa Cruz	SC-20780	1:500
Shank1-2-3	Santa Cruz	SC393963	1:500

Tabla 4-3 Anticuerpos secundarios usados para inmunofluorescencia

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

4.4.1 Análisis de microscopía confocal

Todas las microfotografías fueron tomadas usando microscopio confocal Digital Eclipse C1-Plus Modular Confocal System (Nikon Instruments Inc. NY, USA). Se obtuvieron tres secciones representativas de cada cerebro seleccionadas de forma manual, aproximadamente en la misma localización ventro-dorsal para cubrir las regiones anterior, media y posterior de cada cerebro. Las microfotografías fueron obtenidas por medio de microscopía de barrido confocal de cada sección coronal correspondiente a diferentes planos focales a una magnificación 20x (1024 x 1024 pixeles en un área de 634,88 x 634,8

μm). Cada microfotografía es un promedio de 12 barridos laser. Las imágenes fueron tomadas en la misma localización: el giro dentado, las regiones CA3 y CA1 del hipocampo, la corteza entorinal y la neocorteza. El área de cobertura y el número de células fueron cuantificados en el campo óptico completo. La cuantificación fue realizada usando software ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD).

4.5 Evaluación de la expresión de proteínas

Después de la realización de las pruebas comportamentales, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se realizó extracción manual de hipocampo y corteza. Los tejidos extraídos se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta su almacenamiento a -80°C.

4.5.1 Extracción y cuantificación de proteína

Los tejidos se homogeneizaron en un homogenizador (ProScientific PRO200). velocidad máxima durante 20 s en 300 μL de buffer RIPA (RIPA lysis buffer Santa Cruz Biotechnology REF. sc-24948) conteniendo inhibidores de proteasas y fosfatasas (Thermo Scientific™ Pierce™ Phosphatase Inhibitor Mini Tablets). Posteriormente el homogenizado fue sometido a sonicación en ultrasonido (QSonica CL-18) con amplitud de salida de 30% durante 10 segundos. A continuación, se realizó centrifugación (12500 g) a 4°C durante 15 minutos en microcentrífuga (Thermo Scientific™ Microcentrífuga Sorvall™ Legend™ Micro 17R, refrigerada). Por último, se cuantificó la proteína total del extracto usando el método del ácido bicinconínico (BCA) (Thermo Scientific™ Micro BCA™ Protein Assay Kit) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

4.5.2 Western Blot

Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida denaturante SDS-PAGE, con una carga de 20 μg de proteína total a 100 V durante 2 horas.

Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una membrana PVDF (Amersham Hybond™-P; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) previamente activada con metanol (metanol 20% en buffer Towin 1X) a 250 mV por 2 horas y ésta se incubó en buffer de bloqueo (leche descremada en polvo al 5% en solución TBS-Tween 20) durante 1 hora a

temperatura ambiente. A continuación, se incubó la membrana con los anticuerpos primarios a 4°C durante 18 horas. Después se realizaron 3 lavados de 5 minutos c/u con buffer TTBS 1X para luego incubar con anticuerpo secundario durante 2 horas, finalmente se realizan dos lavados con buffer TTBS 1X por 5 minutos y se revela la membrana en fotodocumentador con sistema de inmunodetección quimioluminiscente ECL (Invitrogen™ Novex™ ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit WP20005). Las densitometrías se realizaron con software ImageLab (Image Lab Software Resources | Life Science Research | Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Los anticuerpos primarios y secundarios usados en el Western Blot se presentan en la **Tabla 4-4** y la **Tabla 4-5**

Tabla 4-4 Anticuerpos primarios usados para Western Blot

Anticuerpo	Marca	Referencia	Dilución
Sinapsina-1	Santa Cruz	SC-20780	1:1000
ABCA1	Abcam	Ab18180	1:1000
p-Akt	Cell Signaling	92715	1:1000
Akt	Cell Signaling	4691L	1:1000
Iba-1	Abcam	Ab5076	1:1000
PSD-95	Santa Cruz	SC-32290	1:1000
Beta-actin	Sigma-Aldrich	A3854	1:50000

Tabla 4-5 Anticuerpos secundarios usados para Western Blot

Anticuerpo	Marca	Referencia	Dilución
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz	sc-2004	1:1000
Goat anti-mouse IgG	Santa Cruz	sc-2008	1:1000
Donkey anti-goat IgG-HRP	Santa Cruz	sc-2020	1:1000

4.5.3 Análisis Estadístico

Se usó prueba ANOVA de dos vías y test post-hoc de Bonferroni para el análisis de datos de la prueba de comportamiento

Se usó prueba ANOVA de una vía (asumiendo distribución normal) y test post-hoc de Bonferroni para el análisis de datos de inmunofluorescencias y cuantificación de Western Blot. El análisis estadístico fue realizado con Software Graph Pad Prism versión 6 (Graph Pad Software Inc.). Los resultados son expresados como la media $\pm$ error estándar de la media (SEM), la significancia estadística fue fijada en $p \leq 0.05$.

5. Resultados

5.1 *Zanthoxylum caribaeum* mejora la memoria espacial en animales 3xTg-AD

Con el propósito de evaluar el efecto del extracto de *Zanthoxylum caribaeum* sobre la cognición se utilizó el laberinto acuático de Morris (MWM, del inglés *Morris Water Maze*). Se seleccionó una dosis inicial de 25 mg/kg/día durante 18 semanas en animales de doce meses de edad teniendo en cuenta la seguridad de la dosis para un tratamiento de largo término de un extracto novedoso. En la prueba de aprendizaje, se observó que los animales Littermates (WT-Veh) reducen la latencia de llegada a la plataforma a lo largo de los días. Respecto a los animales controles 3xTg-AD tratados con el vehículo se observó que no reducen la latencia de llegada a la plataforma. Con relación a los animales 3xTg-AD tratados con el extracto no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la latencia de llegada a la plataforma entre las sesiones. Así mismo los patrones de las curvas de aprendizaje entre animales 3xTg-AD tratados con el vehículo y con el extracto es similar (**Figura 5-1 A**).

En la prueba de aprendizaje se evaluaron los parámetros de distancia recorrida y velocidad media (**Figura 5-1 B y C**) Se observa que los animales WT-Veh recorren el laberinto con una velocidad superior a la de animales 3xTg-AD-Veh y 3xTg-AD-*Zc,* Siendo el grupo de animales 3xTg-AD-Zc el que presentó la menor velocidad con respecto a los otros grupos. Al analizar la distancia recorrida (**Figura 5-1 C**), se observa que los animales 3xTg-AD-*Zc* reducen la distancia recorrida a lo largo de la prueba. Estos resultados podrían sugerir mayor tiempo de exploración en algún perímetro específico del laberinto.

Adicionalmente, se realizó un análisis de los patrones de las estrategias de navegación espacial dependientes del hipocampo (**Figura 5-2**). Se encontró que los animales WT-Littermates aumentan el uso de herramientas espaciales (dependientes del hipocampo) a lo largo de la prueba de aprendizaje. Así mismo, en el grupo 3xTg-AD-Veh predominan

estrategias no espaciales como Tigmotaxis, búsqueda aleatoria y exploración, lo que implica que no se evidenció un proceso de consolidación del aprendizaje espacial. En el grupo de animales 3xTg-AD-*Zc* se observa un mayor uso de estrategias de navegación espacial dependientes del hipocampo, aunque se observa un porcentaje considerable de persistencia de estrategias no espaciales (exploración). Sin embargo, la preferencia de estrategias espaciales sugiere que el tratamiento tiene un efecto sobre el aprendizaje espacial dependiente del hipocampo en animales 3xTg.AD.

En la prueba de retención se observó que los animales littermates (WT-Littermates) permanecen más tiempo en las cercanías a la plataforma respecto a los animales 3xTg-AD tratados con vehículo (P>0.005). Respecto a los animales 3xTg-AD tratados con el extracto se observó que permanecen más tiempo en las cercanías de la plataforma con respecto a animales 3xTg-AD tratados con el vehículo (**Figura 5-3 A,B**).

Figura 5-1 Resultados Prueba de aprendizaje luego de 18 semanas de tratamiento con el extracto de *Zanthoxylum caribaeum*:

(A) Análisis de tiempos de latencia de llegada a la plataforma. (B) Distancia recorrida durante la prueba. (C) Velocidad media durante la prueba de aprendizaje. Las diferencias estadísticas fueron evaluadas con ANOVA de dos vías, seguido por test de comparaciones múltiples de Bonferroni Todos los datos se expresan como la media ± S.E.M. * representa p<0.05 comparado con 3xTg-AD Veh. ## representa p<0.01 comparado con animales WT-Littermates.

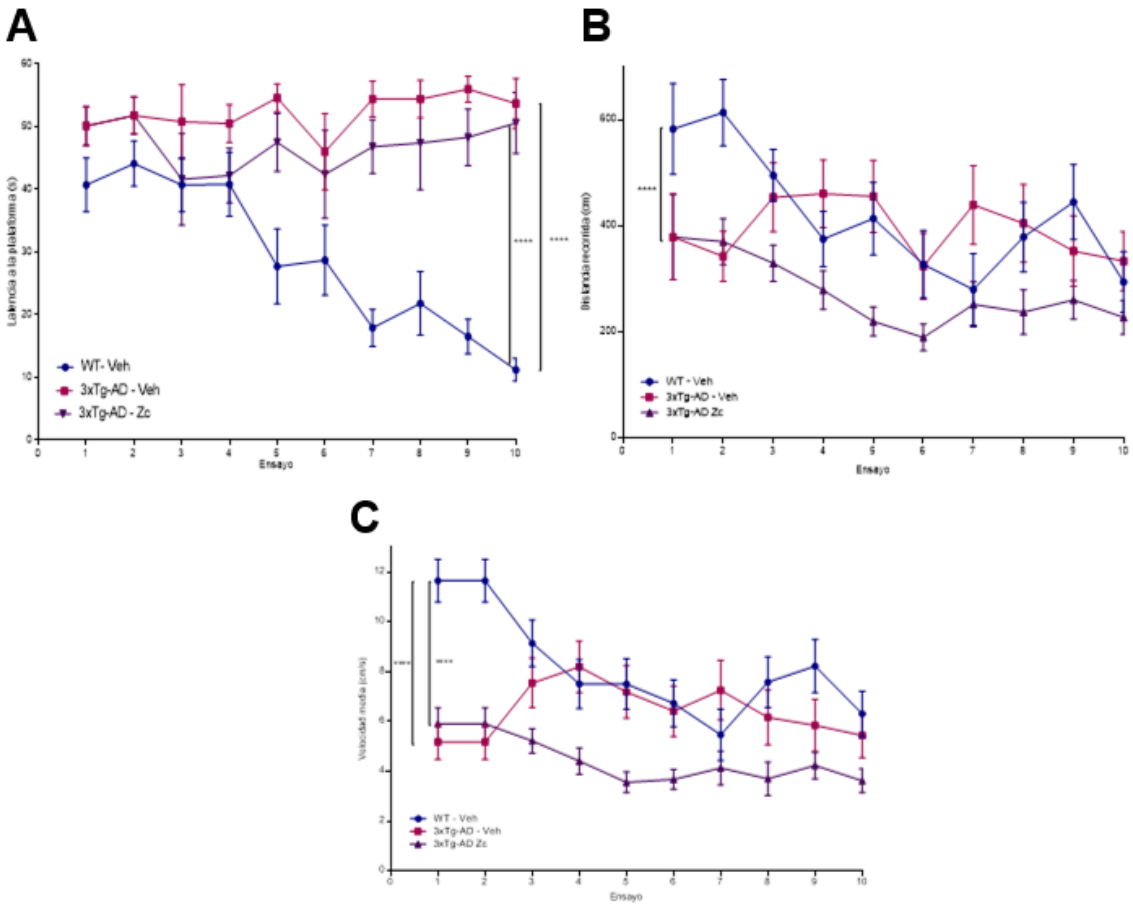


Figura 5-2 Estrategias de navegación espacial utilizadas durante la prueba de aprendizaje

Arriba: Representación esquemática de estrategias de navegación espaciales y no espaciales en MWM. **Abajo:** Efecto del extracto de *Zanthoxylum caribaeu*m en estrategias de aprendizaje espaciales y no espaciales durante MWM. Código de color **Azul rey:** Tigmotaxis, **Azul celeste**: Búsqueda Aleatoria, **Violeta:** Exploración, **Amarillo:** Búsqueda dirigida, **Naranja:** Búsqueda focal, **Rojo:** Nadado directo. **Verde:** pasividad.

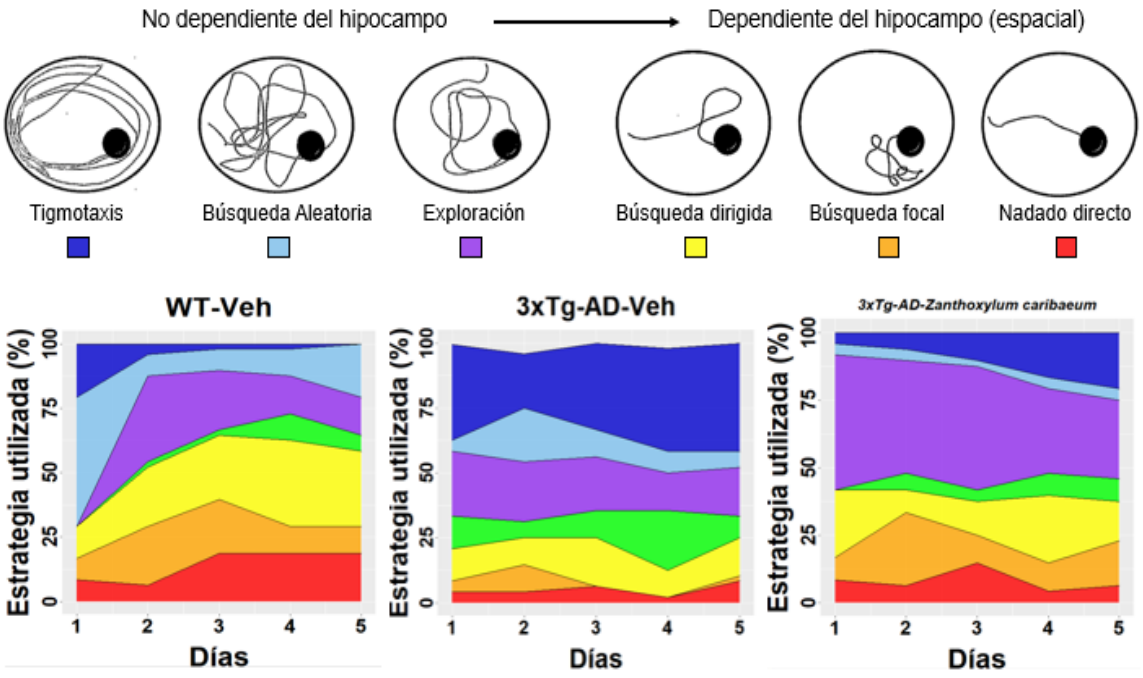
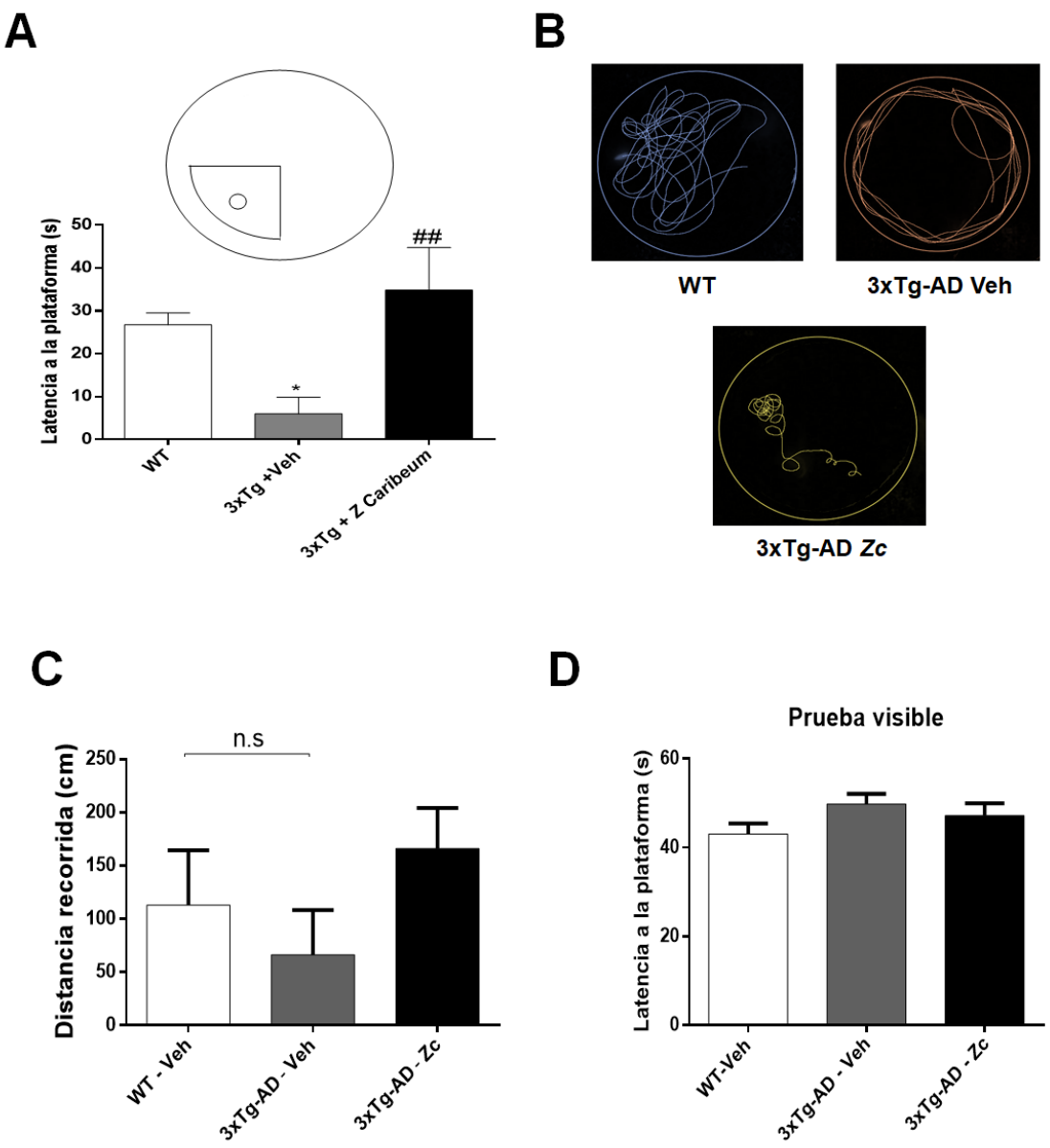


Figura 5-3 Resultados prueba de retención

(A) Análisis manual de las estrategias de búsqueda y comportamiento durante la prueba de retención. **(B)** Muestras representativas de los recorridos durante la prueba de retención en los grupos experimentales. (**C)** Distancia recorrida en el cuadrante meta durante la prueba de retención. **(D)** Latencia de llegada con plataforma visible Todos los datos se expresan como la media ± S.E.M. * representa $p<0.05$ comparado con 3xTg-AD Veh. ## representa $p<0.01$ comparado con animales 3xTg-AD - Veh.



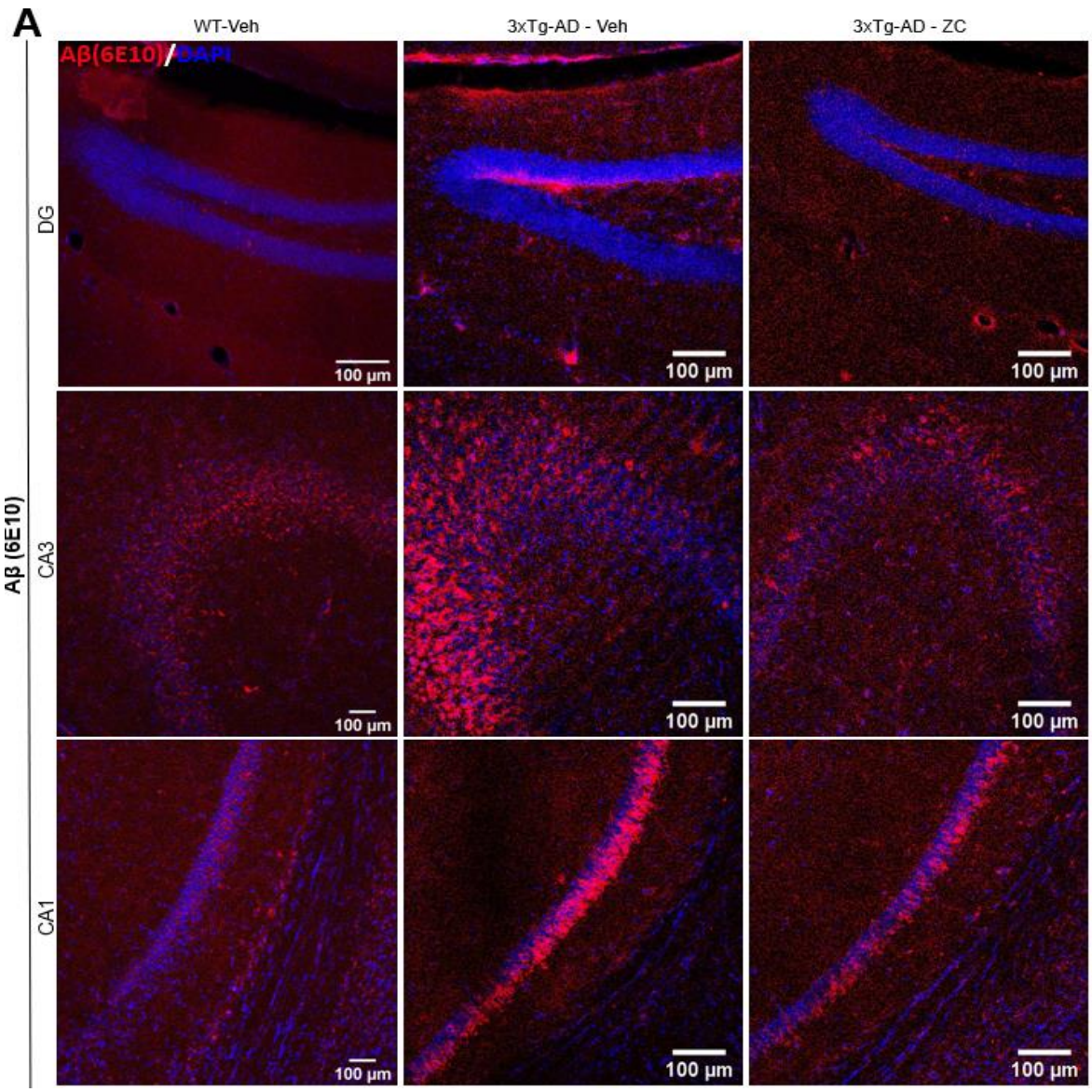
5.2 *Zanthoxylum caribaeum* reduce la patología amiloide y Tau en animales 3xTg-AD

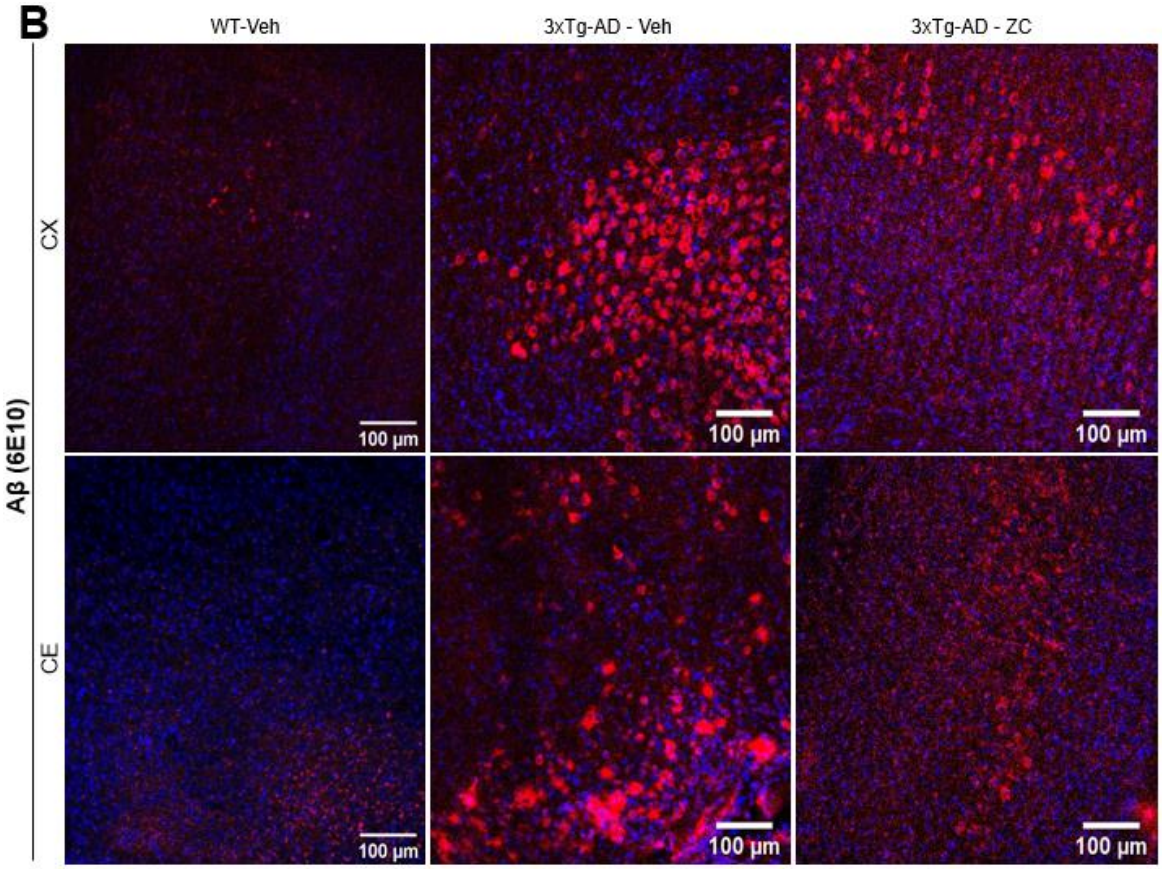
Para determinar si los cambios cognitivos encontrados en animales 3xTg-AD tratados con el extracto se asocian con una reducción de los marcadores histopatológicos Aβ y Tau, se realizó inmunofluorescencia con anticuerpos dirigidos para Aβ (6E10) y Tau (AT8). En relación con el marcador de Aβ (6E10), se observó de manera estadísticamente significativa que los animales 3xTg-AD tratados con vehículo presentaron mayor área de

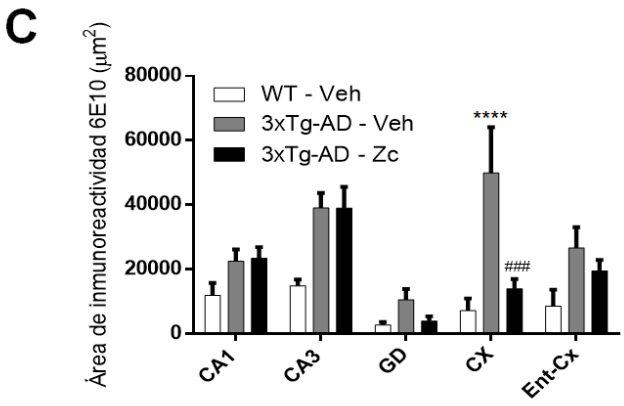
inmunoreactividad positiva en comparación con los animales WT-Littermates, evidencia de la presencia de una patología amiloide exacerbada característica de las regiones del hipocampo y la corteza de animales 3xTg-AD (Belfiore et al., 2019; Oddo et al., 2003) (**Figura 5-4**). El área de las placas Aβ en animales 3xTg-AD tratados con el extracto mostró reducción estadísticamente significativa con respecto a animales 3xTg-AD tratados con vehículo en las regiones CA1 (P<0.001), CA3 (P<0.0'5), Cx (P<0.01) y Cx-Ent (P<0.0001) (**Figura 5-4 A**). El análisis estadístico se realizó con ANOVA de dos vías seguido por test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

Figura 5-4 Efecto de *Zanthoxylum caribaeum* sobre el área de inmunoreactividad para Aβ.

(A) Micrografías representativas de la inmunoreactividad contra Aβ (6E10) (Rojo) obtenidas por microscopía confocal en diferentes regiones del hipocampo (CA1, CA3, GD), **(B)** Corteza (CX) y Corteza Entorrinal (Ent-Cx). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (Azul). **(C)** Análisis semicuantitativo del área de la inmunoreactividad contra Aβ (6E10). Los datos están expresados como la media ± S.E.M. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de dos vías seguido por test de comparaciones múltiples de Bonferroni, los asteriscos (*) representan comparaciones contra el control littermates (Veh) *: p<0.05; **: p<0.05 ***: p<0.001 ****: p<0.0001 ns: no significativo n=5 animales por grupo.


A
WT-Veh
3xTg-AD - Veh
3xTg-AD - ZC
Aβ(6E10)/DAPI
Aβ (6E10)
DG
CA3
CA1
100 µm



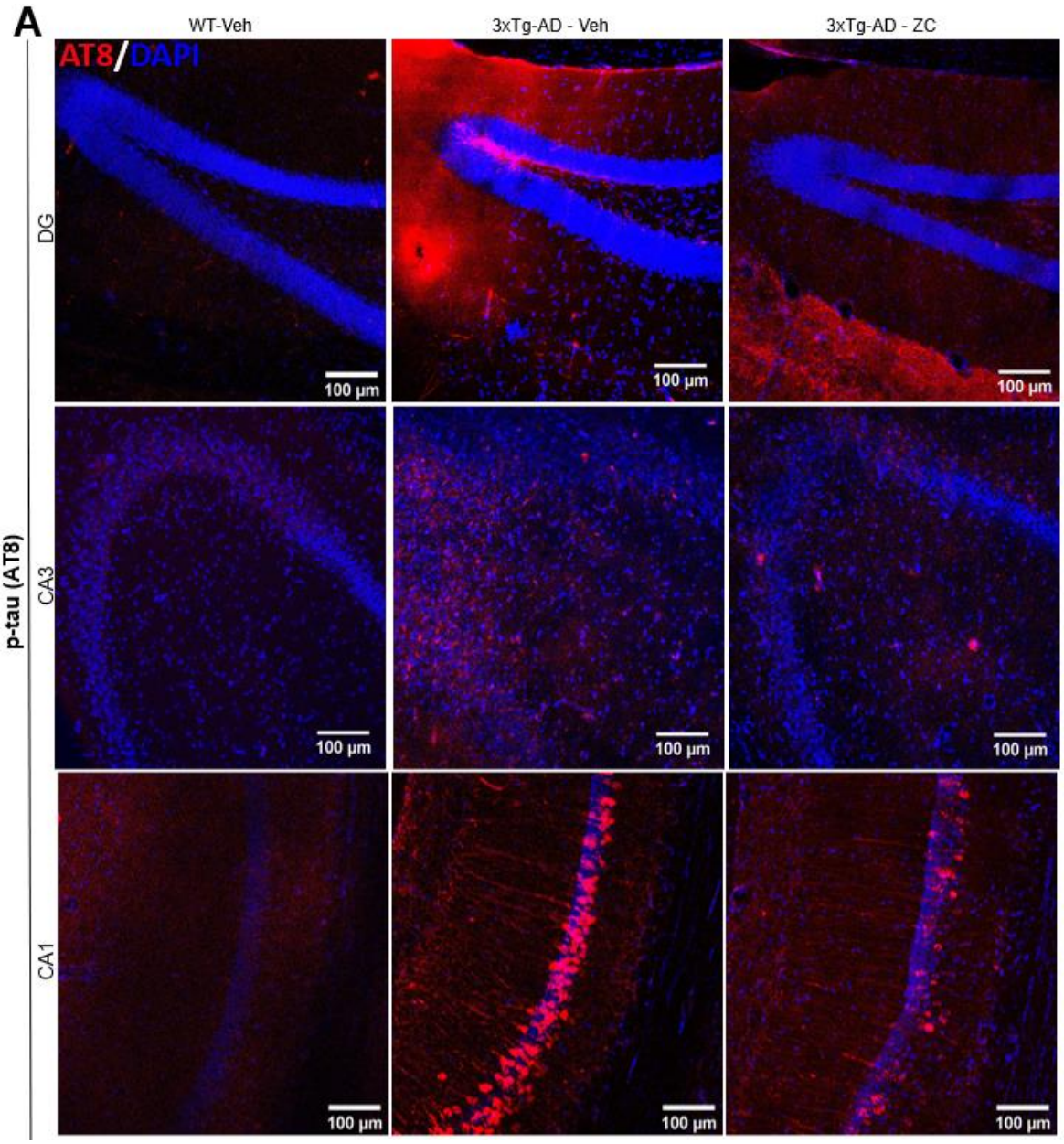


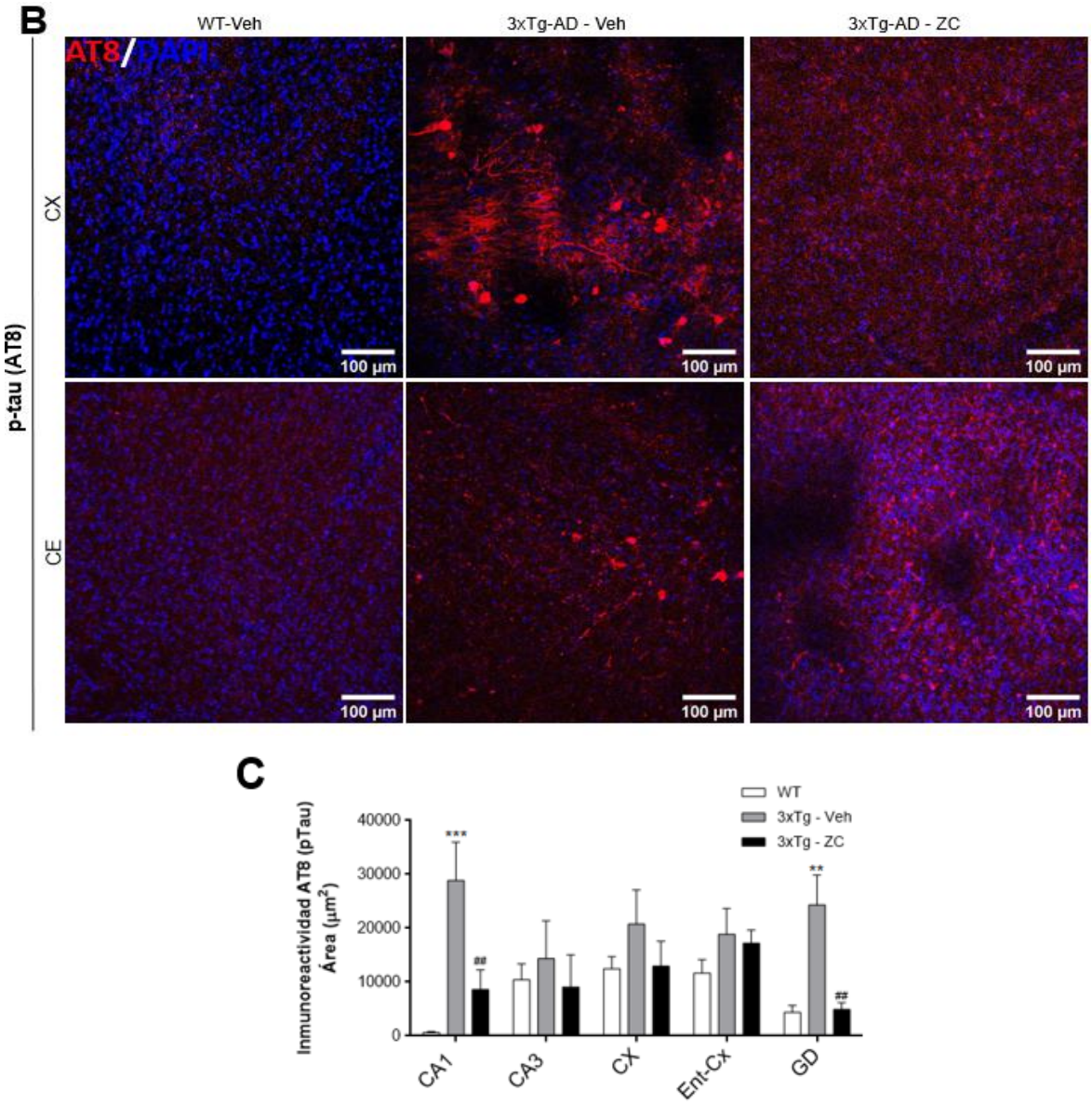
Con respecto a la patología Tau, se observó de manera estadísticamente significativa que los animales 3xTg-AD tratados con vehículo presentan las mayores áreas de inmunoreactividad en todas las regiones de hipocampo y la corteza, coincidiendo con el desarrollo de la patología en el modelo murino. Los animales WT-Littermates no presentan la mutación humana de Tau, por lo cual no presentan marcaje (**Figura 5-5**). Los animales

3xTg-AD tratados con el extracto muestran una reducción estadísticamente significativa de la inmunoreactividad para este marcador. Este efecto se observó en las regiones CA1 y Giro dentado (GD) del hipocampo (**Figura 5-5 C**).

Figura 5-5 El extracto de *Zanthoxylum caribaeum* reduce de forma significativa la patología tau

(A-B) Se evaluó el efecto del extracto sobre la patología tau por inmunofluorescencia contra el anticuerpo AT8 (Rojo), núcleos con DAPI (Azul). de cortes de tejido criopreservados en **(A)** Hipocampo y **(B)** Corteza. **(C)**. Análisis semicuantitativo del área de inmunoreactividad +AT8. Los datos son expresados como la media ± S.E.M. El análisis estadístico fue realizado mediante ANOVA de dos vías seguido por test de comparaciones múltiples de Bonferroni. (*) representa diferencias entre grupo WT – Veh y 3xTg-AD (#) representa diferencias entre grupo 3xTg-AD – Veh y 3xTg-AD – *Zc.* *: $p<0.05$; **: $p<0.05$ ***: $p<0.001$ ****: $p<0.0001$ ns: no significativo n=5 animales por grupo.


A
WT-Veh
3xTg-AD - Veh
3xTg-AD - ZC
AT8/DAPI
p-tau (AT8)
DG
CA3
CA1
100 µm



5.3 *Zanthoxylum caribaeum* reduce la inmunoreactividad de GFAP en animales 3xTg-AD

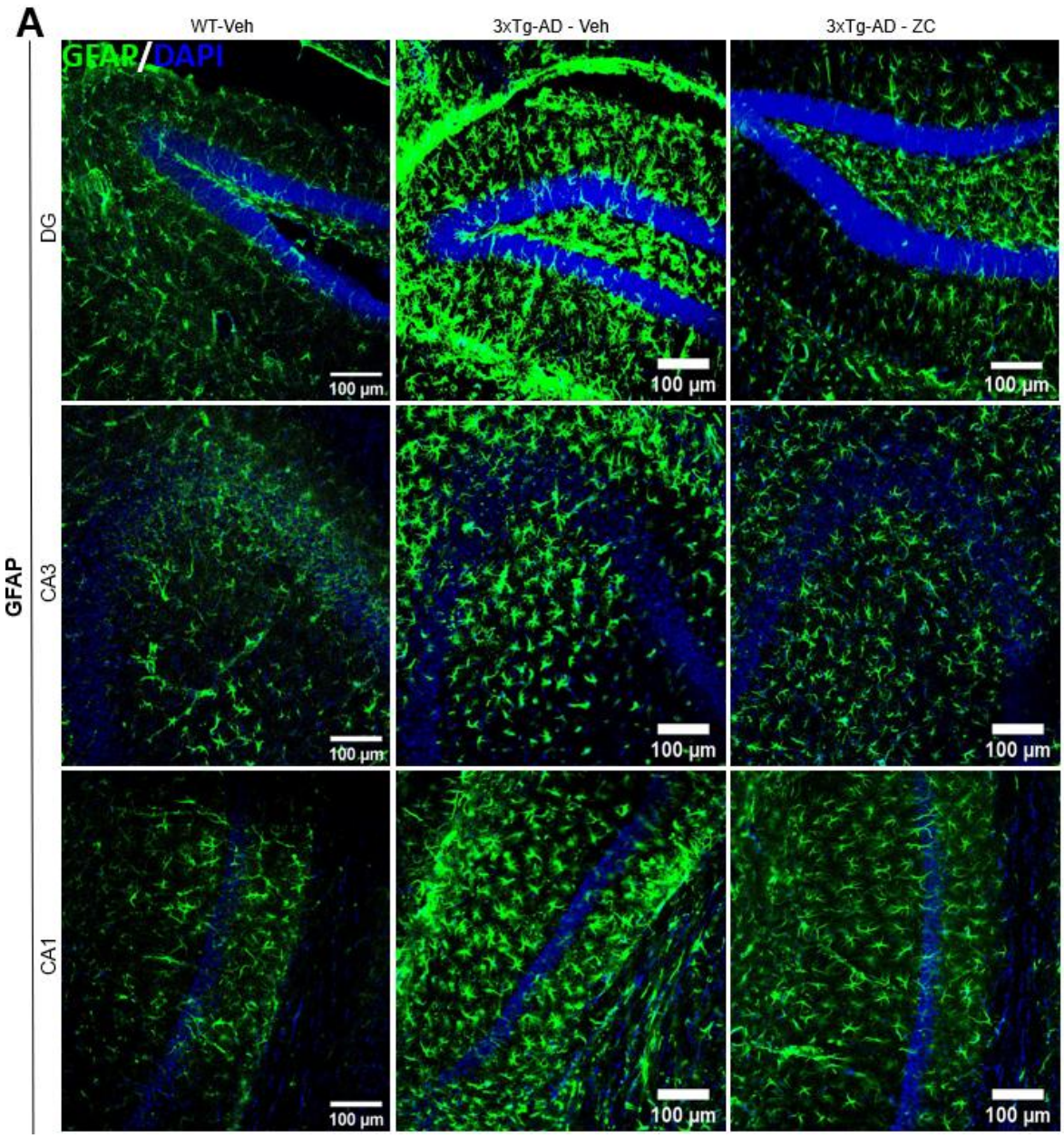
Con el objetivo de evaluar el efecto del extracto de *Zanthoxylum caribaeum* sobre los marcadores histopatológicos de la EA, se evaluó la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, del inglés Glial Fibrillary Acidic Protein) mediante inmunofluorescencia. Se observó que los animales 3xTg-AD tratados con vehículo presentan una mayor área de inmunoreactividad contra GFAP de manera estadísticamente significativa en comparación con animales littermates (WT-Littermates) (**Figura 5-6** C). Con respecto a los animales

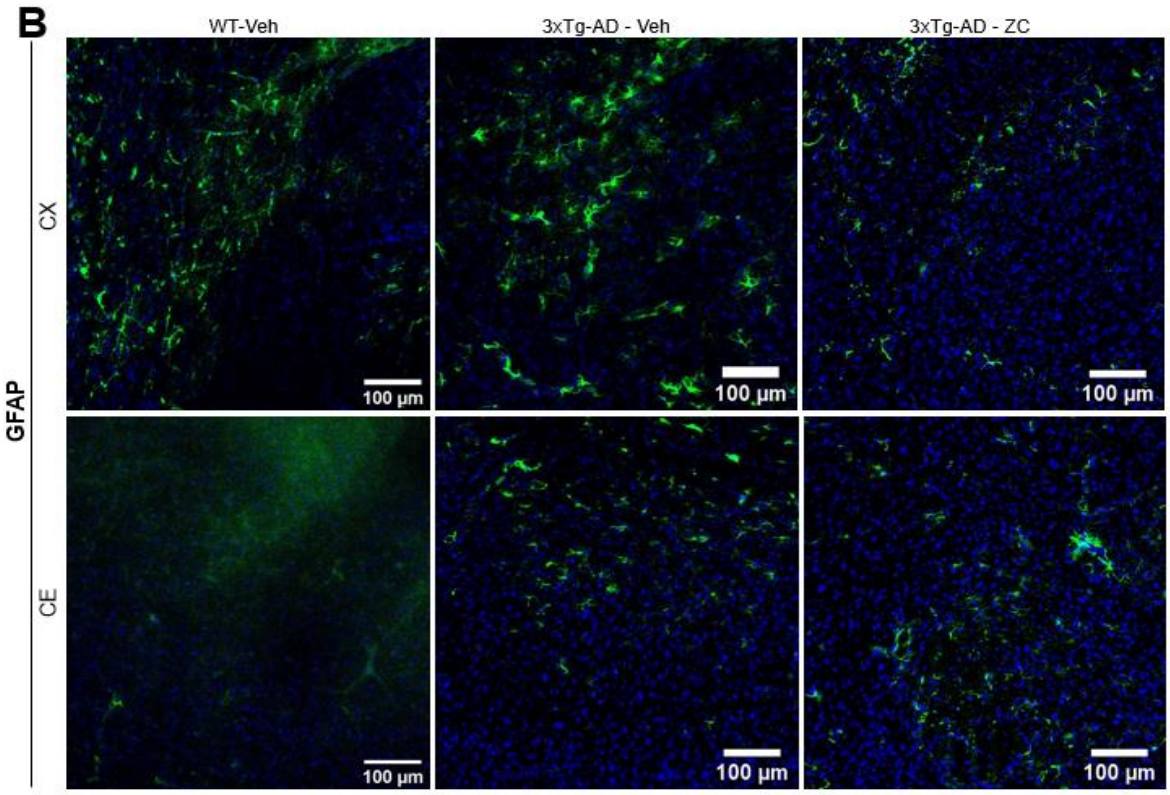
3xTg-AD tratados con el extracto de *Zanthoxylum caribaeum* se evidenció una reducción estadísticamente significativa de la inmunoreactividad contra GFAP con respecto a animales 3xTg-AD tratados con el vehículo en las regiones CA1, CA3 Giro Dentado (DG) y corteza, sin observar diferencias estadísticas con los animales WT-Littermates (**Figura 5-6**).

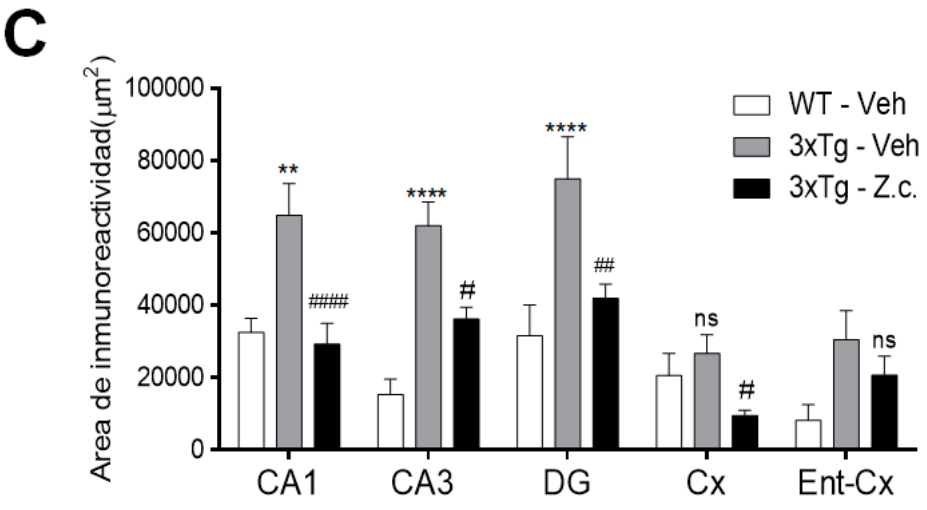
Figura 5-6 El extracto de *Zanthoxylum caribaeum* reduce la astrogliosis en animales 3xTg-AD

(A, B) Micrografías representativas de inmunoreactividad de +GFAP (Verde) mediante microscopía confocal en **(A)** Hipocampo y **(B)** Corteza. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (Azul) **(C)** Análisis semicuantitativo del área de inmunoreactividad +GFAP. El análisis estadístico fue realizado mediante test ANOVA de dos vías, seguido por test de correlaciones múltiples de Bonferroni, (*) representa diferencias entre grupo WT – Veh y 3xTg-AD (#) representa diferencias entre grupo 3xTg-AD – Veh y 3xTg-AD – *Zc.* *: $p<0.05$;

**: p<0.05 ***: p<0.001 ****: p<0.0001 ns: no significativo n=5 animales por grupo.







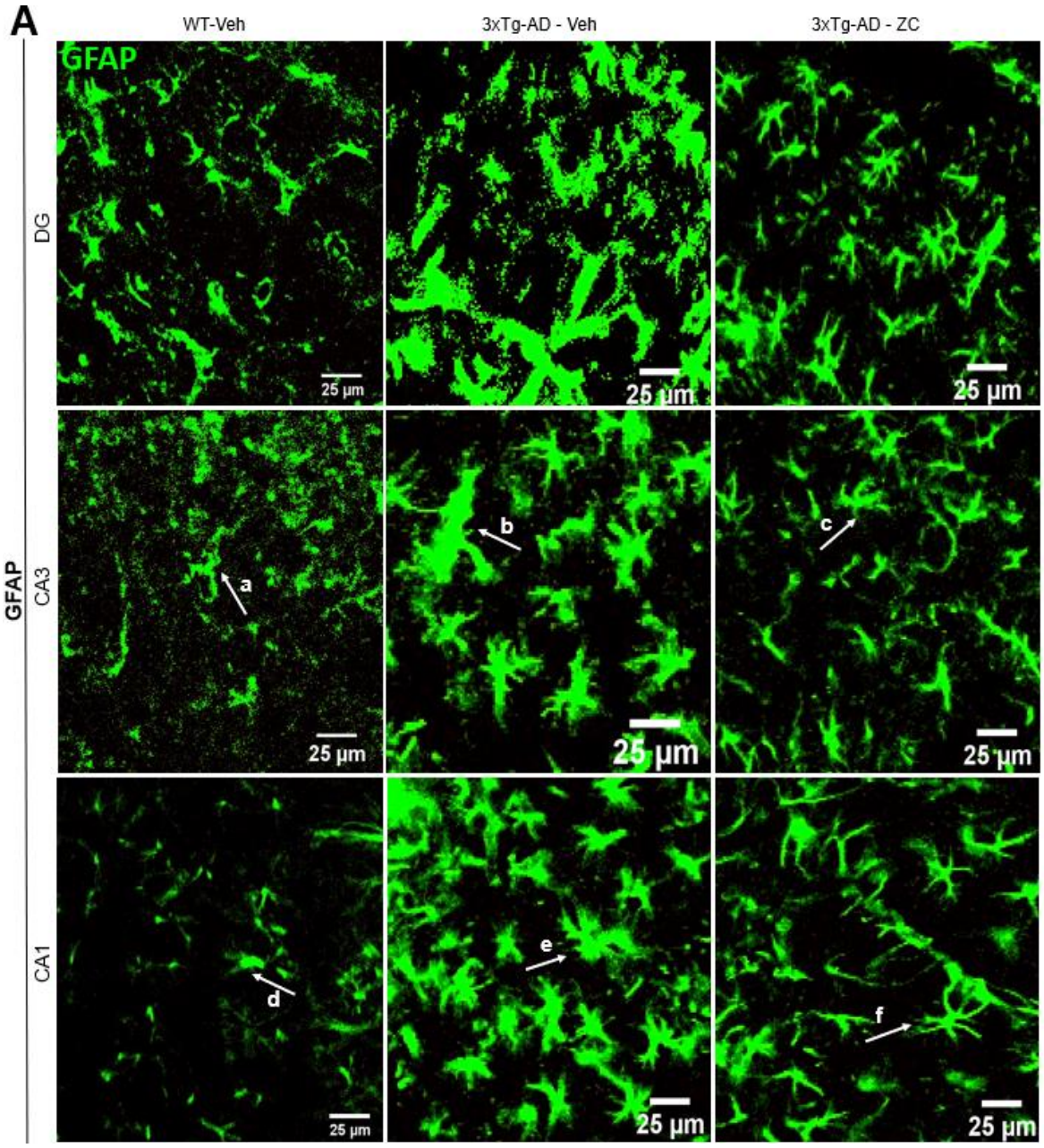
Con respecto a los cambios en la morfología astrocitaria inducida por el tratamiento con *Zanthoxylum caribaeum*, en la astrogliosis reactiva (flechas blancas)(Zhou, Xia, Ruo, & Jiang, 2019). Los astrocitos de animales WT presentan un soma y prolongaciones pequeños y delgados, ver las flechas (a) y (d), en contraste, los astrocitos observados en animales 3xTg-AD tratados con el vehículo presentan un soma y prolongaciones gruesos

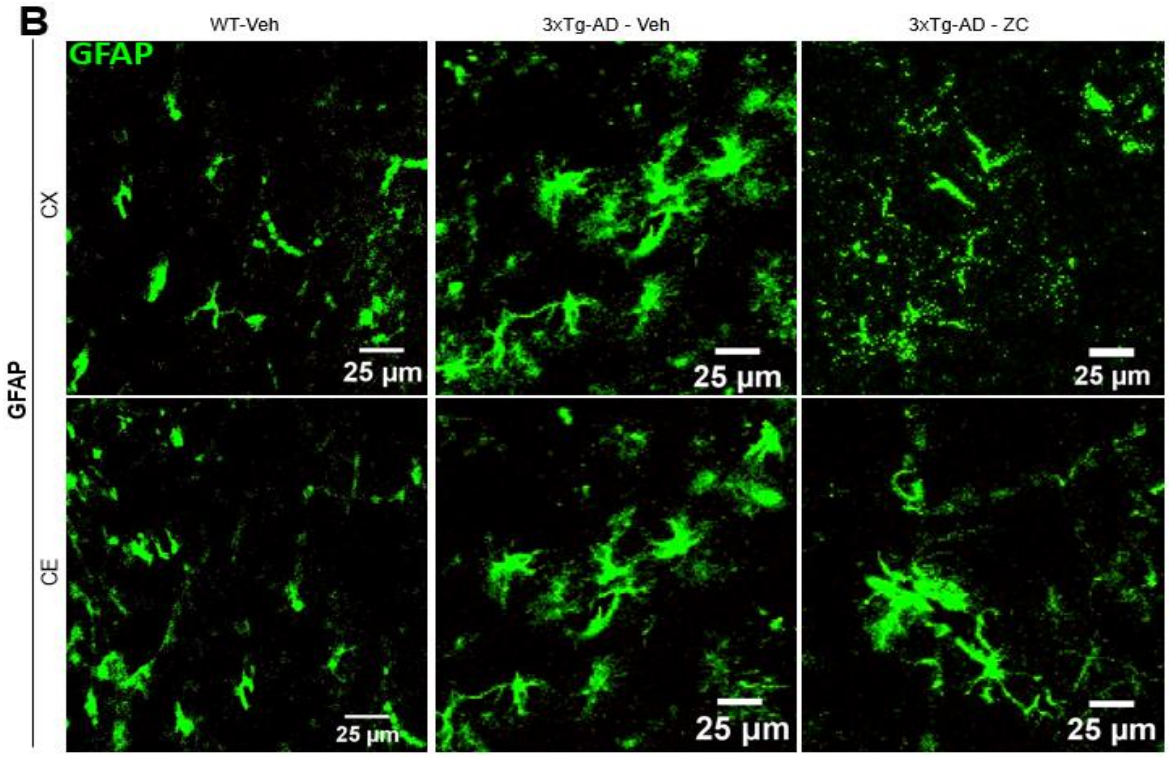
y las prolongaciones son cortas y pequeñas, ver las flechas (b) y (e), lo que coincide con un proceso de astrogliosis reactiva propia de etapas intermedias y avanzadas de la EA en el modelo 3xTg-AD. Los animales 3xTg-AD tratados con el extracto presentan una morfología astrocitaria similar a la observada en animales WT-Littermates, flechas (c) y (f). En resumen, se evidencia una reversión de los procesos de activación astrocitaria evidenciada tanto a nivel de la morfología celular como en el análisis del area de la inmunoreactividad en los de animales 3xTg-AD tratados con el extracto.

Figura 5-7 se muestra una amplificación de las regiones subgranulares de las diferentes regiones del hipocampo y de regiones representativas de la corteza a 200x, evidenciando cambios en la morfología astrocitaria. Teniendo en cuenta que los filamentos intermedios positivos para GFAP son reconocidos como marcadores de astrogliosis reactiva (flechas blancas)(Zhou, Xia, Ruo, & Jiang, 2019). Los astrocitos de animales WT presentan un soma y prolongaciones pequeños y delgados, ver las flechas (a) y (d), en contraste, los astrocitos observados en animales 3xTg-AD tratados con el vehículo presentan un soma y prolongaciones gruesos y las prolongaciones son cortas y pequeñas, ver las flechas (b) y (e), lo que coincide con un proceso de astrogliosis reactiva propia de etapas intermedias y avanzadas de la EA en el modelo 3xTg-AD. Los animales 3xTg-AD tratados con el extracto presentan una morfología astrocitaria similar a la observada en animales WT-Littermates, flechas (c) y (f). En resumen, se evidencia una reversión de los procesos de activación astrocitaria evidenciada tanto a nivel de la morfología celular como en el análisis del area de la inmunoreactividad en los de animales 3xTg-AD tratados con el extracto.

Figura 5-7 El tratamiento con *Zanthoxylum caribaeum* reduce la inmunoreactividad para GFAP en las diferentes regiones de hipocampo y la corteza.

Se muestran las diferencias en el marcaje para GFAP (Verde) en las regiones del hipocampo y la corteza en los diferentes grupos experimentales. Magnificación 200X de las regiones subgranulares de las diferentes regiones del hipocampo


A
WT-Veh
3xTg-AD - Veh
3xTg-AD - ZC
GFAP
GFAP
DG
CA3
CA1
a
b
c
d
e
f
25 µm



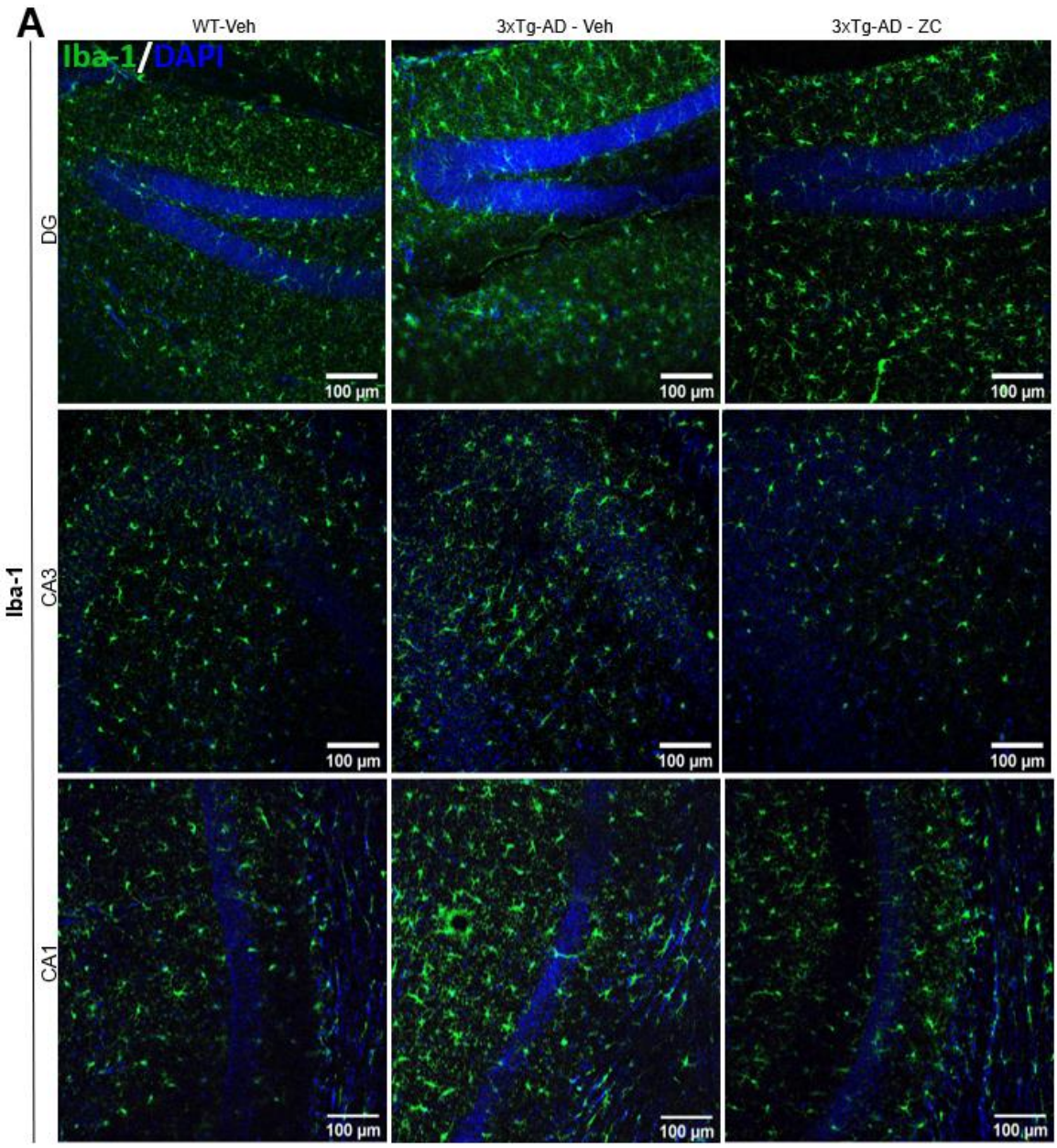
5.4 *Zanthoxylum caribaeum* reduce la inmunoreactividad de Iba-1 en animales 3xTg-AD

El proceso inflamatorio es uno de los mecanismos activos en la EA, cuya importancia ha dado origen a hipótesis de la etiopatología de la enfermedad. Con el propósito de evaluar el efecto del extracto de *Zanthoxylum caribaeum* sobre la neuroinflamación, se evaluó la inmunofluorescencia para el marcador de microglía reactiva Iba-1. Respecto a la morfología celular (**Figura 5-9**) Se observa en animales WT-Littermates que las células positivas para Iba-1 presentan somas y prolongaciones pequeños ver flechas a, d y g. Adicionalmente, las ramificaciones son localizadas y no se extienden en el intersticio. En contraste, los animales 3xTg-AD tratados con vehículo presentan más ramificaciones y extensiones del soma ver flechas b, e y h, lo que concuerda con un proceso inflamatorio activo. Esta morfología es más evidente en las regiones CA1 y GD del hipocampo y Corteza cerebral. Adicionalmente, los animales 3xTg-AD tratados con el extracto presentan menor número y extensión de las prolongaciones evidenciado en las flechas c, f e i, lo que estaría evidenciando un posible efecto antiinflamatorio del extracto.

Respecto a los análisis semicuantitativos se observó un proceso inflamatorio exacerbado en animales 3xTg-AD tratados con el vehículo con respecto a animales WT (littermates), de manera estadísticamente significativa. Adicionalmente se observó que el tratamiento de animales 3xTg-AD con *Zanthoxylum caribaeum* reduce el área de inmunoreactividad +Iba1 con respecto a animales 3xTg-AD tratados con vehículo de una manera estadísticamente significativa en las regiones CA3 y DG del hipocampo (**Figura 5-8 C**).

Figura 5-8 El extracto de *Zanthoxylum caribaeum* reduce la inmunoreactividad para Iba-1 en animales 3xTg-AD

Micrografías representativas de inmunoreactividad de +Iba-1 (Verde) mediante microscopía confocal en **(A)** Hipocampo y **(B)** Corteza cerebral. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (Azul) **(C)** análisis semicuantitativo del área de inmunoreactividad +Iba-1. El análisis estadístico fue realizado mediante test ANOVA de dos vías, seguido por test de correlaciones múltiples de Bonferroni para evaluar significancia. * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$ *** $p \leq 0.001$ (*) Diferencias entre grupos 3xTg-AD-Veh y WT-Veh. (#) Diferencias entre grupos 3xTg-AD-Zc y 3xTg-AD-Veh.


A
WT-Veh
3xTg-AD - Veh
3xTg-AD - ZC
Iba-1/DAPI
Iba-1
DG
CA3
CA1
100 µm

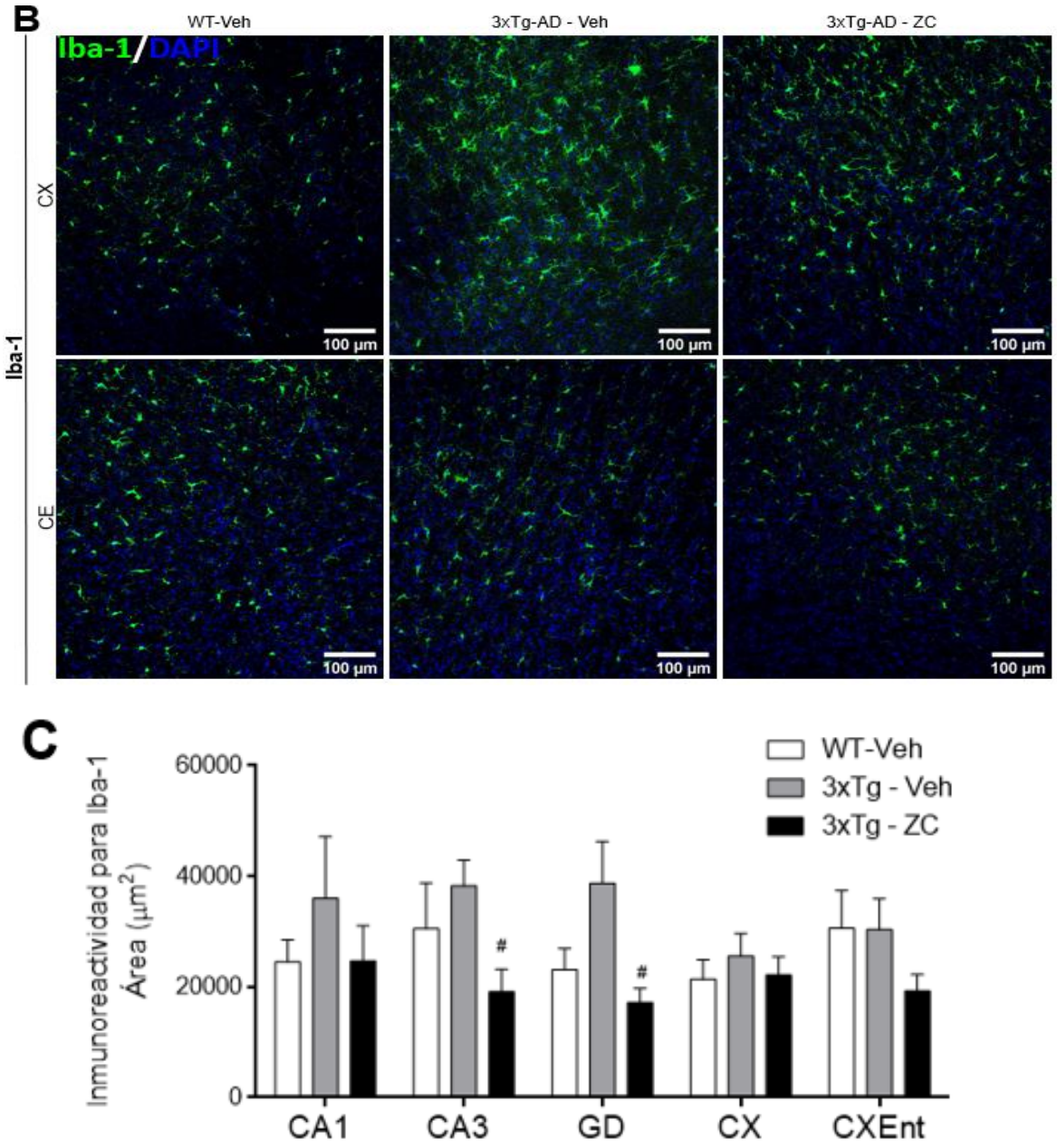
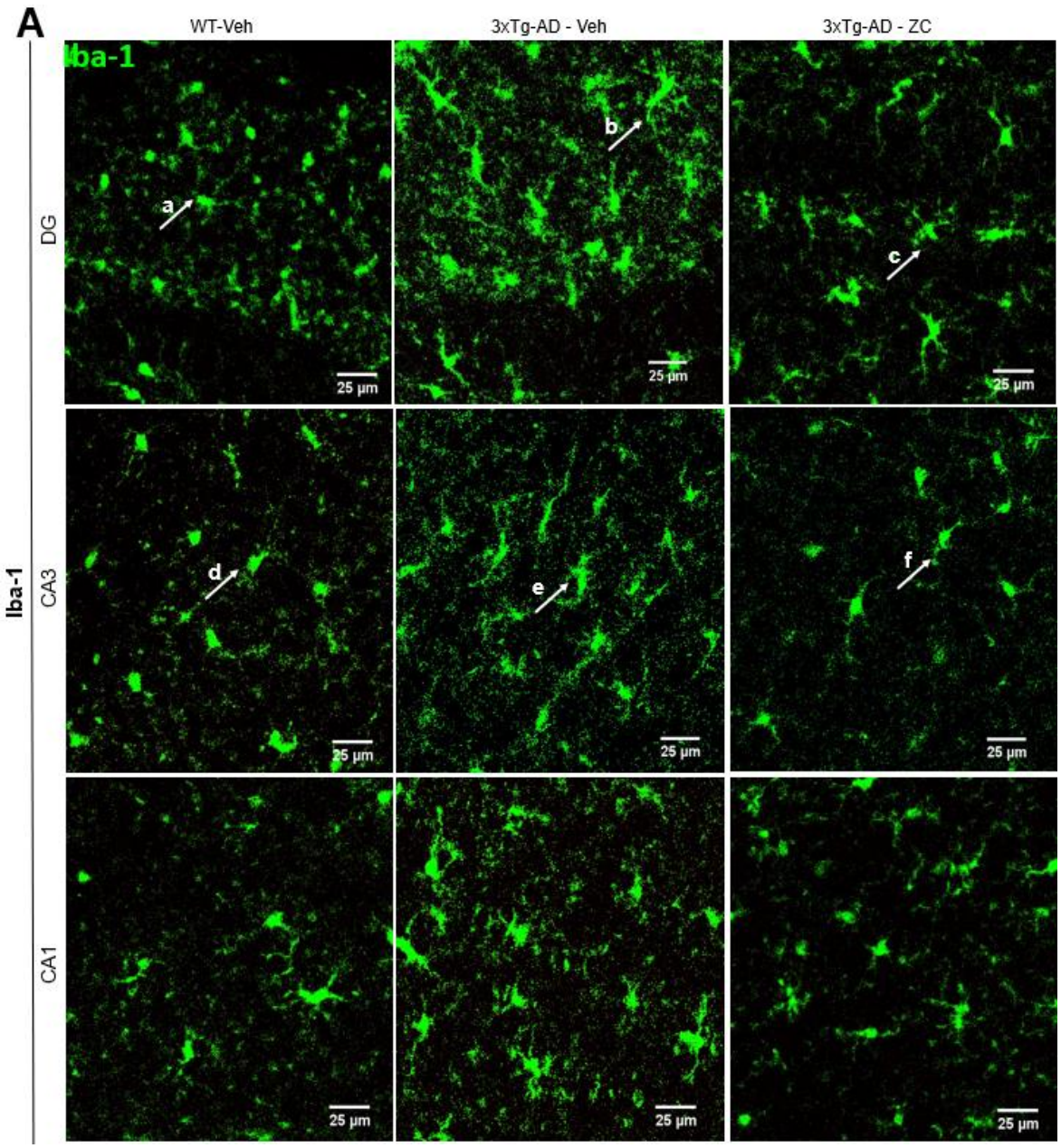
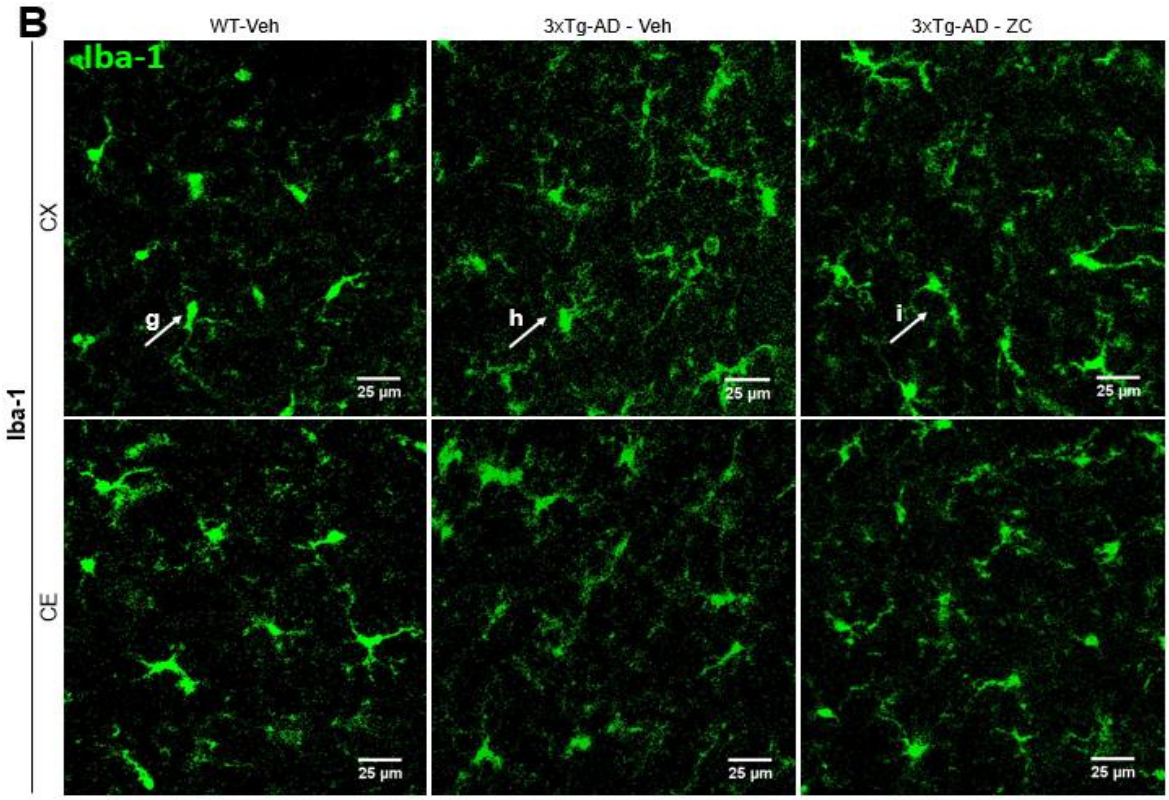


Figura 5-9 El tratamiento con *Zanthoxylum caribaeum* reduce la inmunoreactividad para Iba-1 en animales 3xTg-AD

Se muestran las diferencias morfológicas en el marcaje para Iba-1 de los diferentes grupos experimentales en **(A)** Hipocampo y **(B)** Corteza. Las flechas blancas representan la señalización de los cambios observados.


A
WT-Veh
3xTg-AD - Veh
3xTg-AD - ZC
Iba-1
DG
CA3
CA1
Iba-1
a
b
c
d
e
f
25 µm

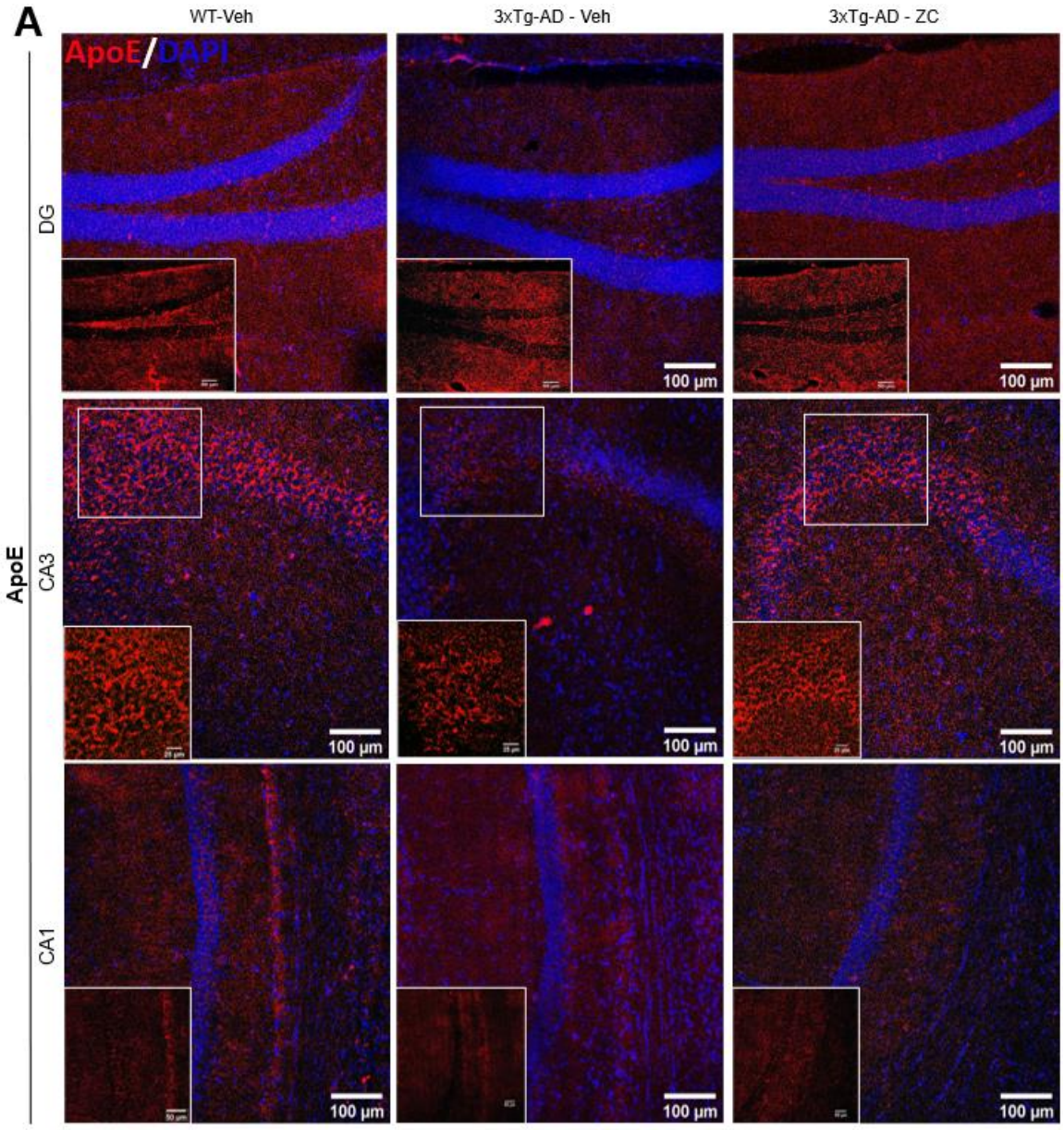


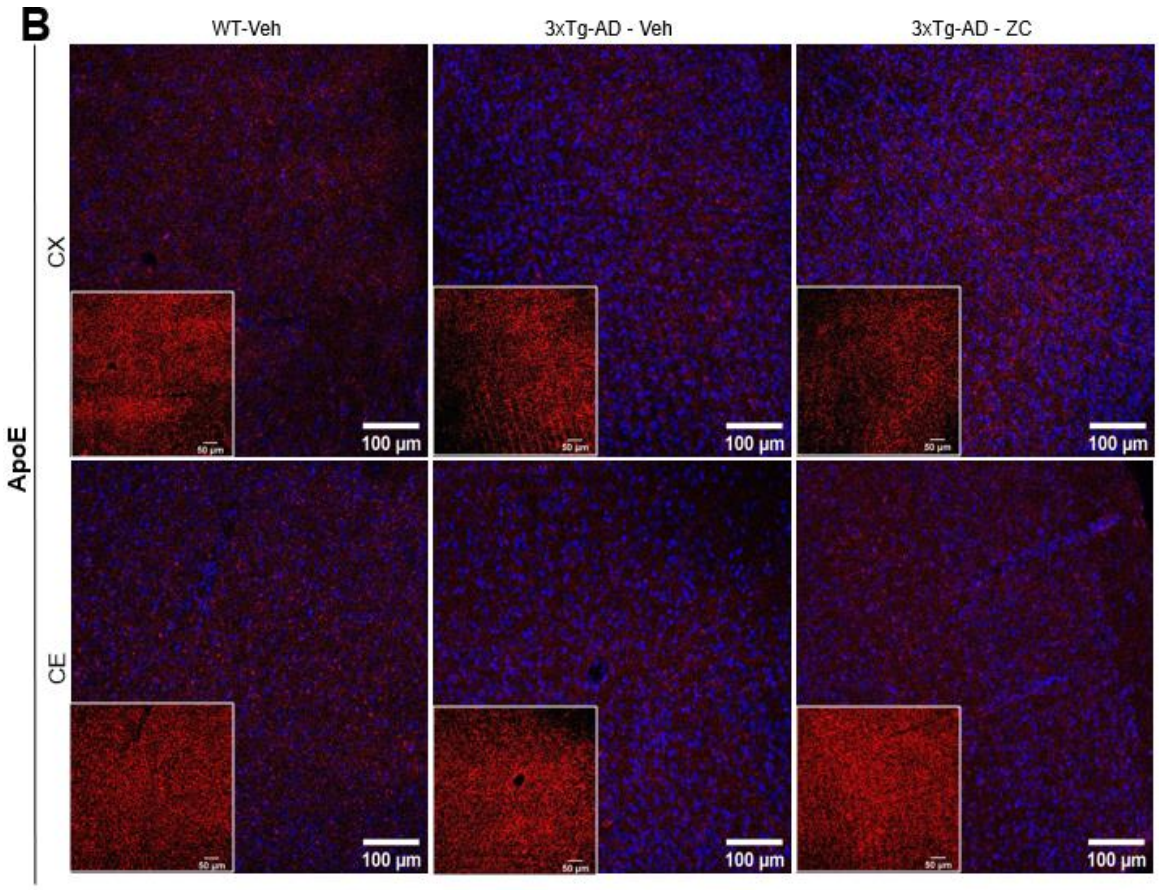
5.5 El tratamiento con *Zanthoxylum caribaeum* aumenta la inmunoreactividad para ApoE en animales 3xTg-AD

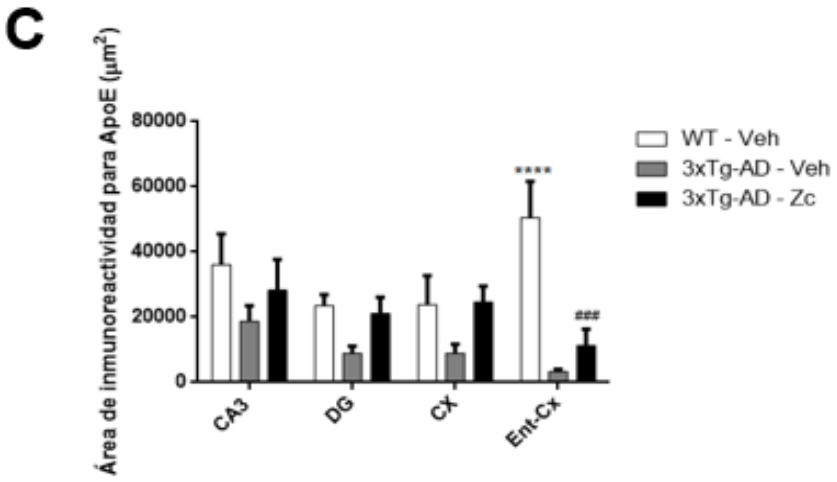
Teniendo en cuenta la actividad LXR del extracto etanólico de *Zanthoxylum caribaeum* en modelos in vitro, se evaluaron los cambios en la expresión de uno de los blancos transcripcionales de LXR como la apolipoproteína E (ApoE) por medio de inmunofluorescencia. La inmunoreactividad +ApoE de animales 3xTg-AD-Veh se encuentra disminuida con respecto a animales WT-Littermates (**Figura 5-10**). Se observó un aumento de la inmunoreactividad a este marcador en animales 3xTg-AD tratados con el extracto con respecto a animales 3xTg-AD Veh. Estos cambios no mostraron significancia estadística en los grupos evaluados. Las modificaciones observadas en la expresión de ApoE pueden atribuirse a un posible efecto de la actividad LXR del extracto de *Zanthoxylum caribaeum.*

Figura 5-10 Efecto del extracto de *Zanthoxylum caribaeum* en la inmunoreactividad para marcador ApoE

Micrografías representativas de la inmunoreactividad de ApoE (Rojo) obtenidas por microscopía confocal en (A) diferentes regiones del hipocampo (CA1, CA3, GD), (B) Corteza (CX) y Corteza Entorrinal (Ent-Cx). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (Azul). Se muestra en recuadros rojos en la esquina inferior izquierda una magnificación 0,75X en el canal Rojo (ApoE) (C) Análisis comparativo del área de inmunoreactividad entre grupos Los datos están expresados como media ± S.E.M. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de dos vías seguido por test de comparaciones múltiples de Bonferroni para evaluar significancia. *: $p<0.05$; **: $p<0.05$ ***: $p<0.001$ ****$p<0.0001$ ns: no significativo n=5 animales por grupo. (*) Diferencias entre grupos 3xTg-AD-Veh y WT-Veh (#) Diferencias entre grupos 3xTg-AD-Zc y 3xTg-AD-Veh


A
WT-Veh
3xTg-AD - Veh
3xTg-AD - ZC
ApoE/DAPI
ApoE
DG
CA3
CA1
100 µm


B
WT-Veh
3xTg-AD - Veh
3xTg-AD - ZC
ApoE
CX
CE
100 µm


C
Área de inmunoreactividad para ApoE (µm²)
80000
60000
40000
20000
0
CA3
DG
CX
Ent-Cx
****
###
WT - Veh
3xTg-AD - Veh
3xTg-AD - Zc

5.6 *Zanthoxylum caribaeum* incrementó la expresión de marcadores del linaje de mielina

Recientemente se describieron mecanismos patogénicos en la EA que se relacionan con la presencia de alteraciones funcionales en las células pertenecientes al linaje de oligodendroglia desde etapas preclínicas en humanos (Barateiro & Fernandes, 2014; Cai & Xiao, 2016). En el modelo murino también se reconoce la presencia de estas alteraciones desde etapas tempranas de la EA (Behrendt et al., 2013). Por este motivo estudiamos el efecto del extracto sobre la expresión de marcadores de células progenitoras de oligodendrocitos (OPCs) utilizando el marcador especifico de Olig2 y de oligodendrocitos maduros a través de la expresión de la Proteína Básica de Mielina (MBP).

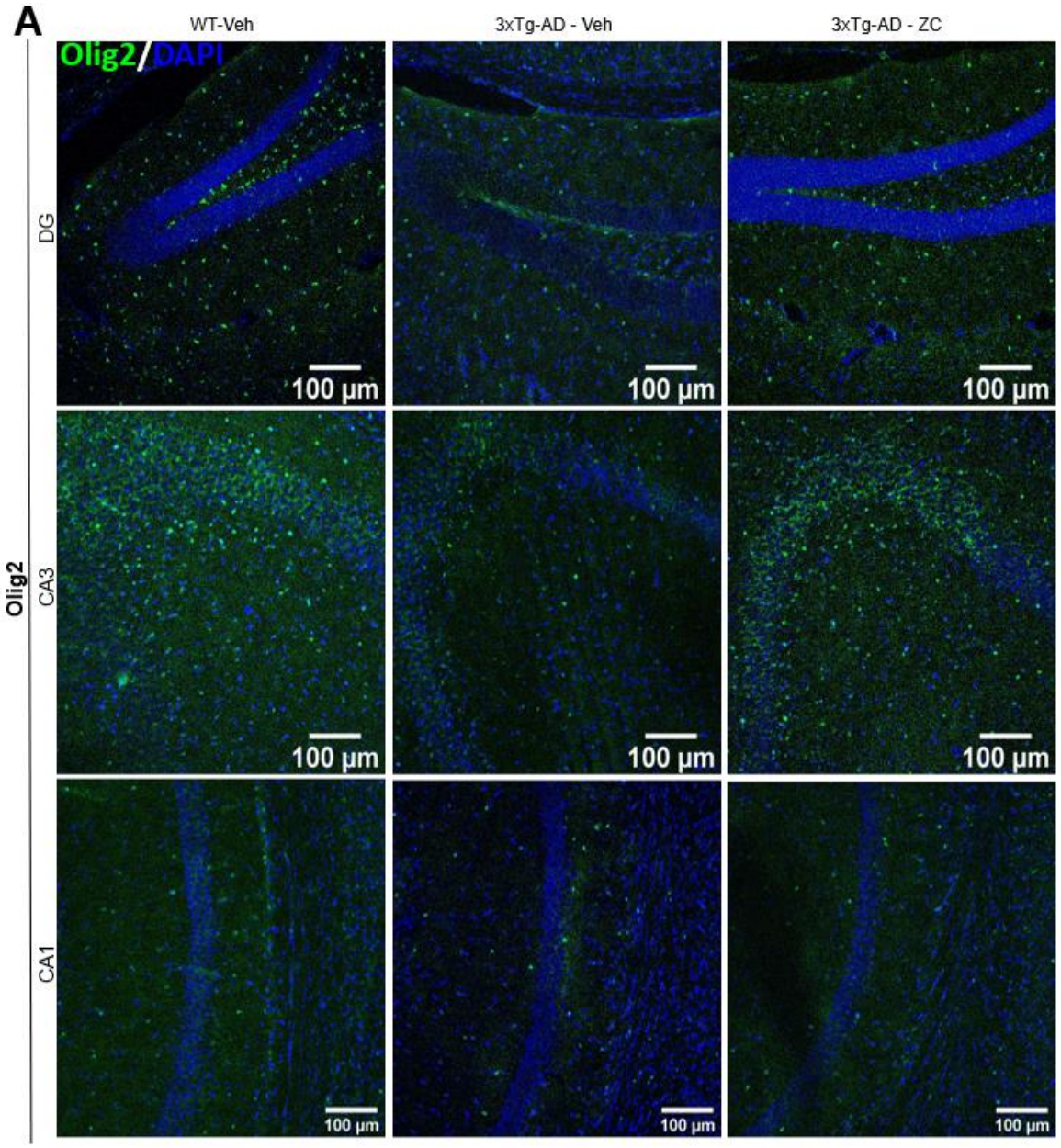
Respecto al marcaje de OPCs, se observó que animales 3xTg-AD presentan una reducción de la expresión de Olig2 en comparación con animales WT-Littermates (**Figura 5-11 A,B**) lo cual ha sido previamente reportado (Behrendt et al., 2013). No se observaron diferencias significativas entre animales 3xTg-AD tratados con el extracto en comparación con animales 3xTg-AD tratados con el vehículo (**Figura 5-11 C**). Sin embargo, se observó una tendencia al incremento de la inmunoreactividad para este marcador en las regiones CA1, CA3 Y DG del hipocampo.

Respecto al marcaje de MBP, se observó que los animales 3xTg-AD tratados con vehículo presentan menor inmunoreactividad para este marcador con respecto a animales WT-Littermates (**Figura 5-12** A). Al estudiar el efecto del extracto de *Zanthoxylum caribaeum* en animales 3xTg-AD se observó que animales tratados presentaron un incremento significativo de la inmunoreactividad con respecto a animales 3xTg-AD tratados con vehículo (**Figura 5-12 C**). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas en la región CA3 del hipocampo y en Corteza entorrinal (**Figura 5-12 C**).

Figura 5-11 Micrografías representativas de la inmunoreactividad de Olig2 (Verde) obtenidas por microscopía confocal

en **(A)** diferentes regiones del hipocampo (CA1, CA3, GD) y **(B)** Corteza (CX) y Corteza Entorrinal (Ent-Cx). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (Azul) **(C)** Análisis comparativo del área de inmunoreactividad entre grupos**. (D)** Conteo de células inmunoreactivas para Olig2 por campo óptico. Los datos están expresados como media ± S.E.M. El análisis

estadístico fue realizado por ANOVA de dos vías seguido por test de comparaciones múltiples de Bonferroni para evaluar significancia. *: p<0.05; **: p<0.05 ***: p<0.001 ****p<0.0001 ns: no significativo n=5 animales por grupo. (*) Diferencias entre grupos 3xTg-AD-Veh y WT-Veh (#) Diferencias entre grupos 3xTg-AD-Zc y 3xTg-AD-Veh



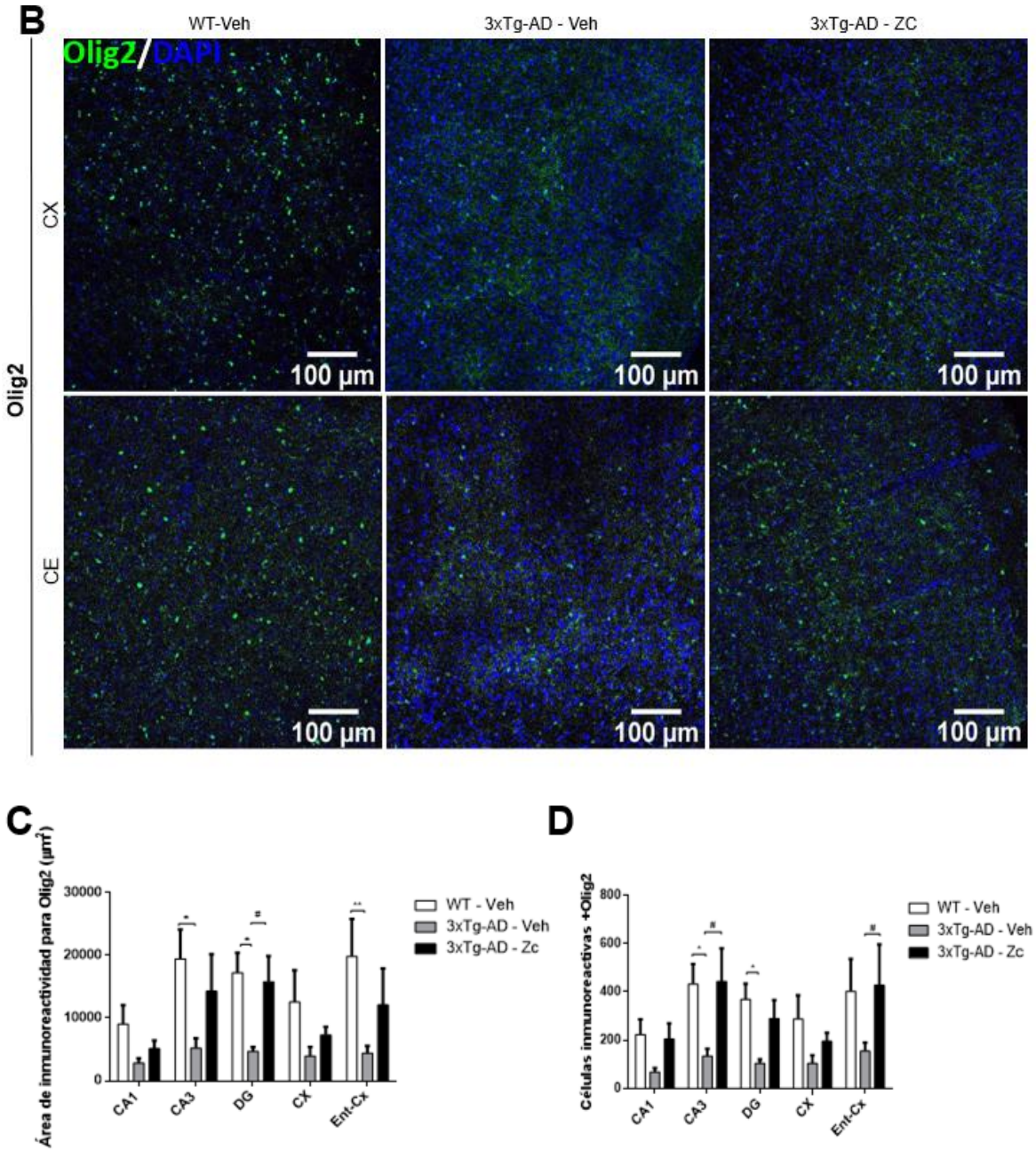
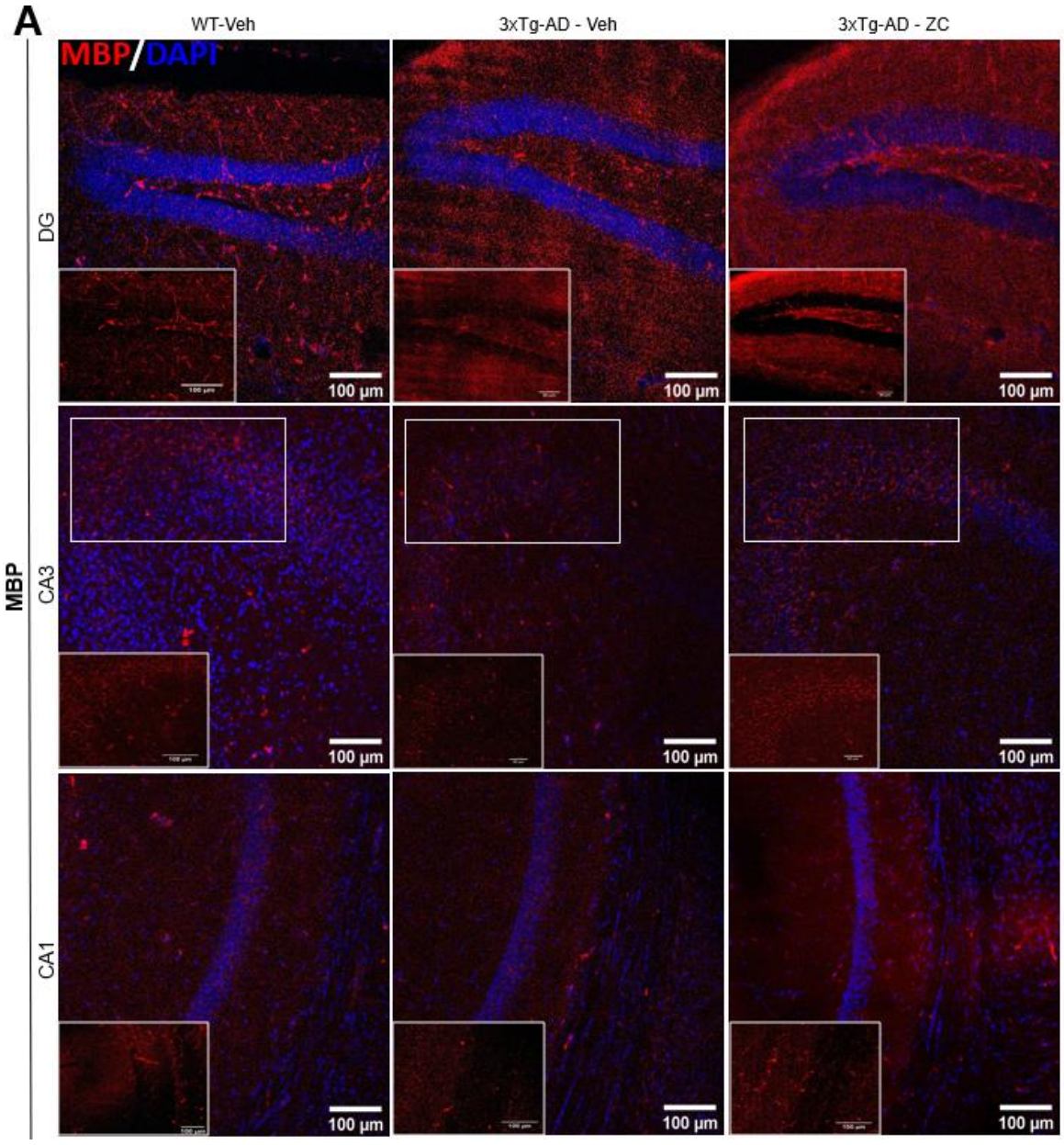
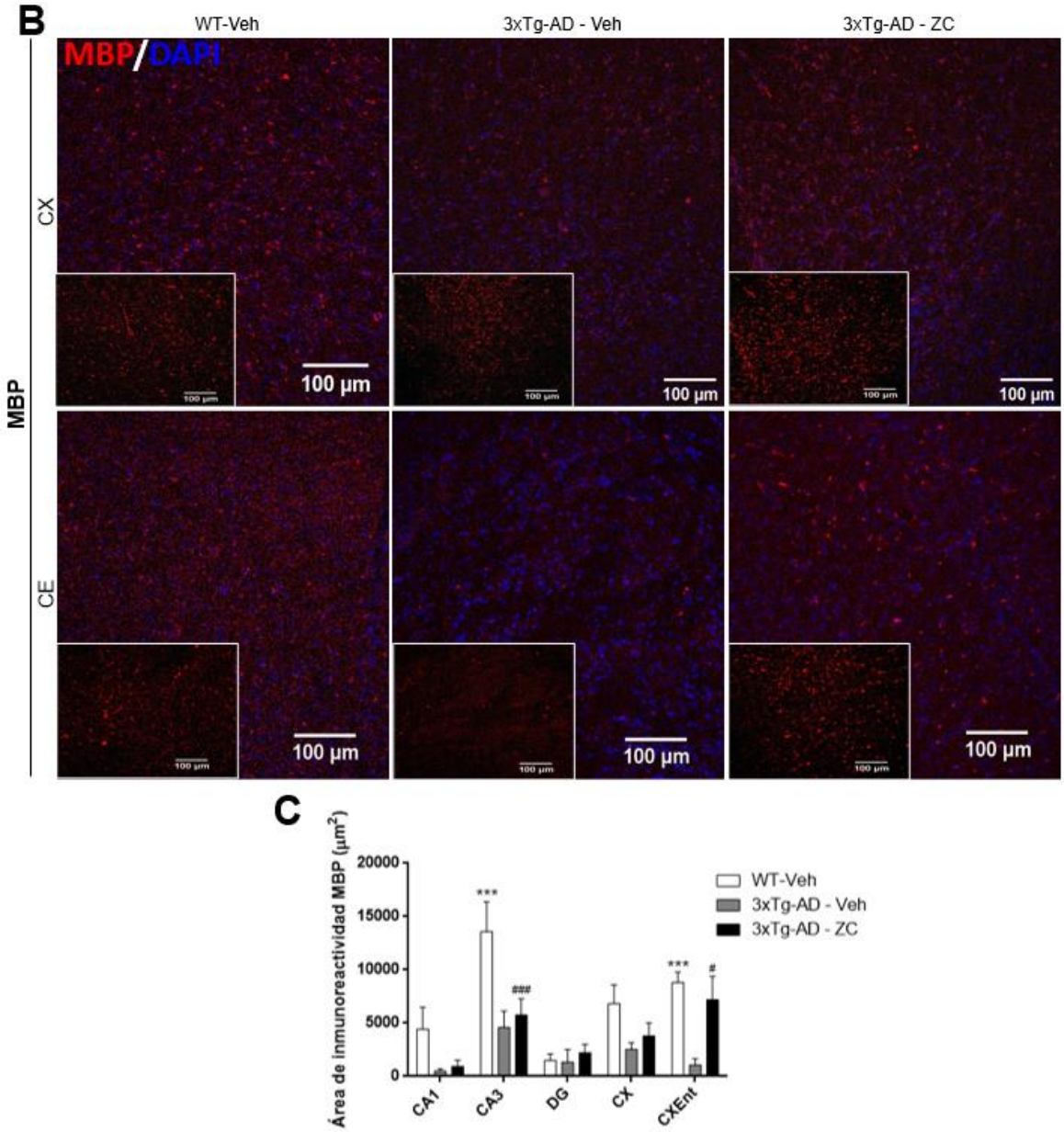


Figura 5-12 Micrografías representativas de la inmunoreactividad para +MBP (Rojo) obtenidas por microscopía confocal

en **(A)** diferentes regiones del hipocampo (CA1, CA3, GD) y **(B)** Corteza (CX) y Corteza Entorrinal (Ent-Cx). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (Azul) Se muestra en recuadros sobre la esquina inferior izquierda una magnificación 0,75X de cada región en el canal Rojo (MBP) **(C)** Análisis comparativo del área de inmunoreactividad entre grupos Los datos

están expresados como media ± S.E.M. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de dos vías seguido por test de comparaciones múltiples de Bonferroni para evaluar significancia. *: p<0.05; **: p<0.05 ***: p<0.001 ****p<0.0001 ns: no significativo n=5 animales por grupo. (*) Diferencias entre grupos 3xTg-AD-Veh y WT-Veh (#) Diferencias entre grupos 3xTg-AD-Zc y 3xTg-AD-Veh.





5.7 El tratamiento con *Zanthoxylum caribaeum* aumenta la inmunoreactividad para el marcador Shank 1-2-3 en animales 3xTg-AD

Recientemente se estudió el efecto de la activación de LXR en cultivos primarios neuronales de hipocampo y se reportaron cambios en la expresión de proteínas sinápticas expuestas a oligómeros de Aβ (oAβ) como las proteínas Shank-2 y el transportador

vesicular de glutamato VGlut1 (Beez-Becerra et al., 2018), lo cual sugiere un efecto de la activación de LXR sobre la dinámica sináptica en modelos celulares neuronales de la EA.

Por su parte, en animales 3xTg-AD, el agonista sintético GW3965 aumentó la expresión de la proteína Sinapsina-1, lo cual fue asociado a cambios epigenéticos, específicamente a la reducción de la metilación de DNA de la región promotora del gen. Este efecto fue comprobado adicionalmente por Western-Blot (Sandoval-Hernández, Adrián G; Hernandez, H.G; Restrepo, A; Muñoz, J.I; Bayon, GF; Fernandez, AF; Fraga, M.F; Cardona-Gomez, G.P; Arboleda, 2016).

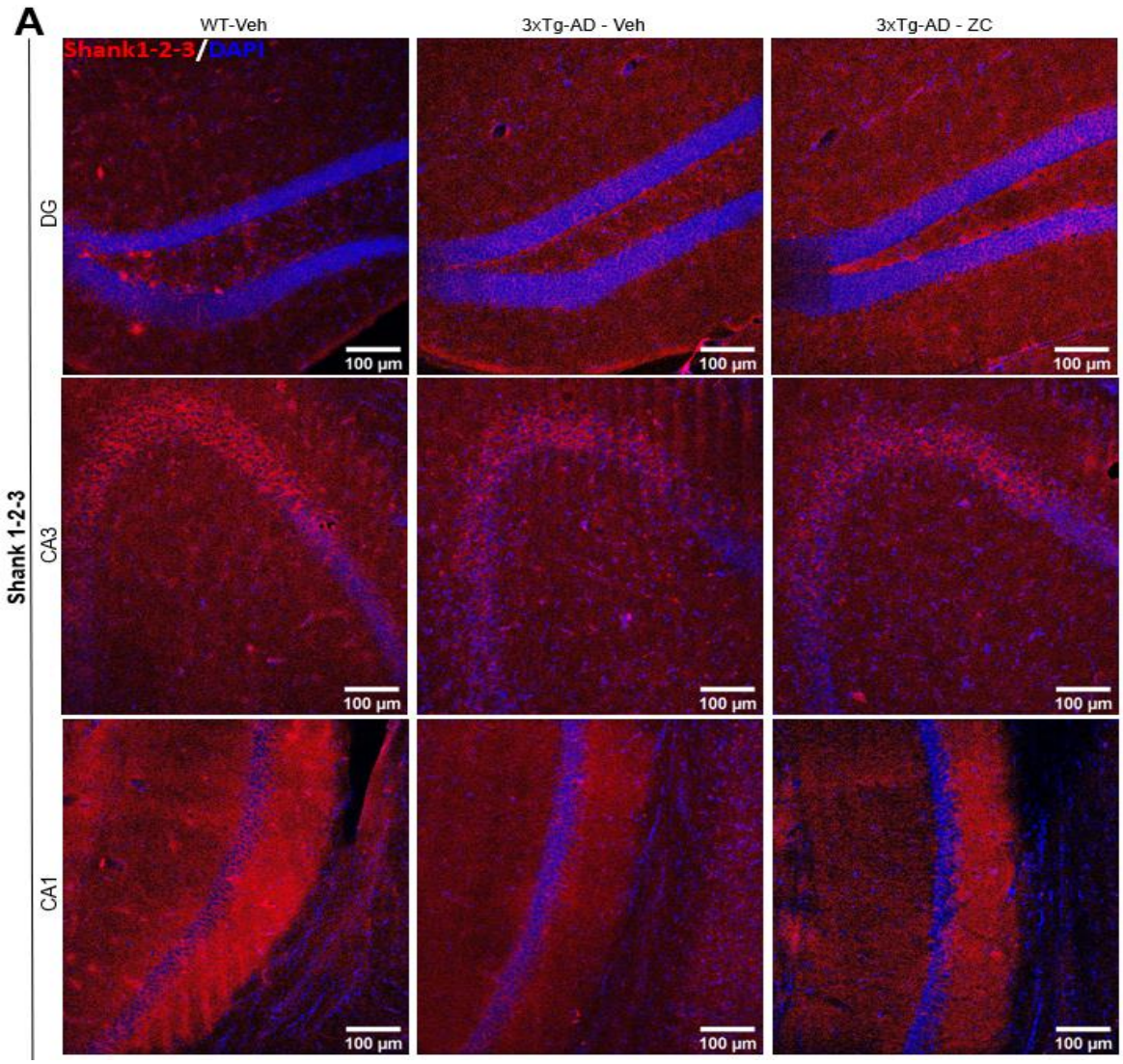
Teniendo en cuenta estos antecedentes, se estudiaron los cambios sinápticos a través de algunas proteínas. Por inmunofluorescencia se evaluó la expresión de Shank1-2-3 (**Figura 5-13**) y Syn1 (**Figura 5-14**). Se observó que animales 3xTg-AD registraron menor área de inmunoreactividad para Shank 1-2-3 con respecto a animales WT Littermates (**Figura 5-13** A,B). Se observó una tendencia al aumento de la inmunoreactividad para Shank1-2-3 en animales 3xTg-AD tratados con el extracto en las áreas de hipocampo y corteza (**Figura 5-13** A, B), pero estos cambios no fueron estadísticamente significativos (**Figura 5-13** C).

Con respecto al marcador Syn-1 se analizaron las regiones correspondientes a la cobertura de fibras musgosas (Hilus y región CA3) (**Figura 5-14** A). Se observó una reducción de la inmunoreactividad para este marcador en animales 3xTg-AD con respecto a animales WT-Littermates. El tratamiento con el extracto se relaciona con cambios tendientes al aumento de la inmunoreactividad para este marcador en animales 3xTg-AD con respecto a animales 3xTg-AD tratados con vehículo. Sin embargo, estos cambios no son estadísticamente significativos (**Figura 5-14** B)

Figura 5-13 Efecto del extracto de *Zanthoxylum caribaeum* en la inmunoreactividad para marcador Shank1-2-3

Micrografías representativas de la inmunoreactividad de Shank 1-2-3 (Rojo) obtenidas por microscopía confocal en (A) diferentes regiones del hipocampo (CA1, CA3, GD), (B) Corteza (CX) y Corteza Entorrinal (Ent-Cx). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (Azul) (C) Análisis comparativo del área de inmunoreactividad entre grupos Los datos están expresados como media ± S.E.M. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de dos vías seguido por test de comparaciones múltiples de Bonferroni para evaluar significancia. *: $p<0.05$; **: $p<0.05$ ***: $p<0.001$ ****$p<0.0001$ ns: no significativo n=5 animales por grupo.

(*) Diferencias entre grupos 3xTg-AD-Veh y WT-Veh (#) Diferencias entre grupos 3xTg-AD-Zc y 3xTg-AD-Veh



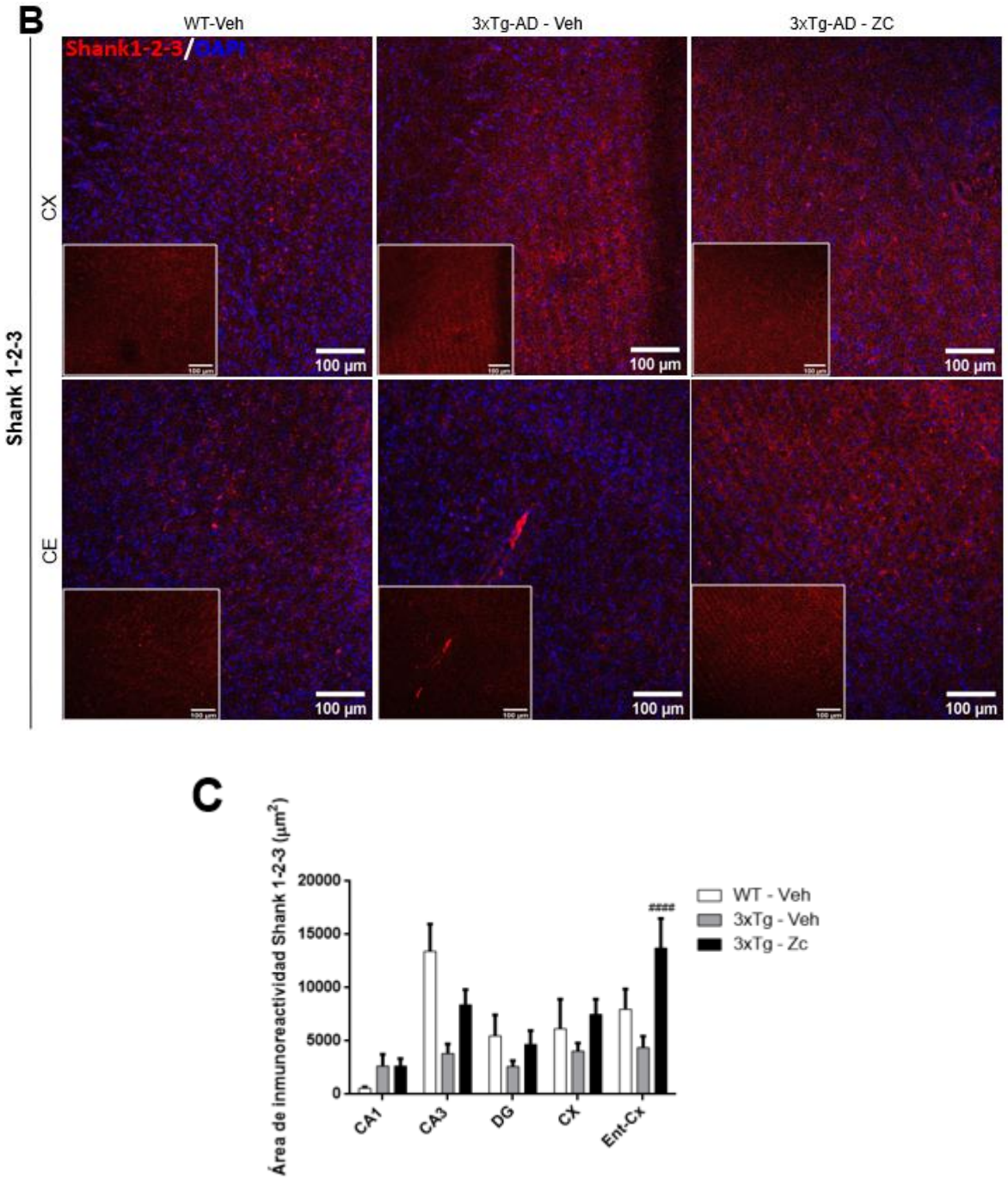
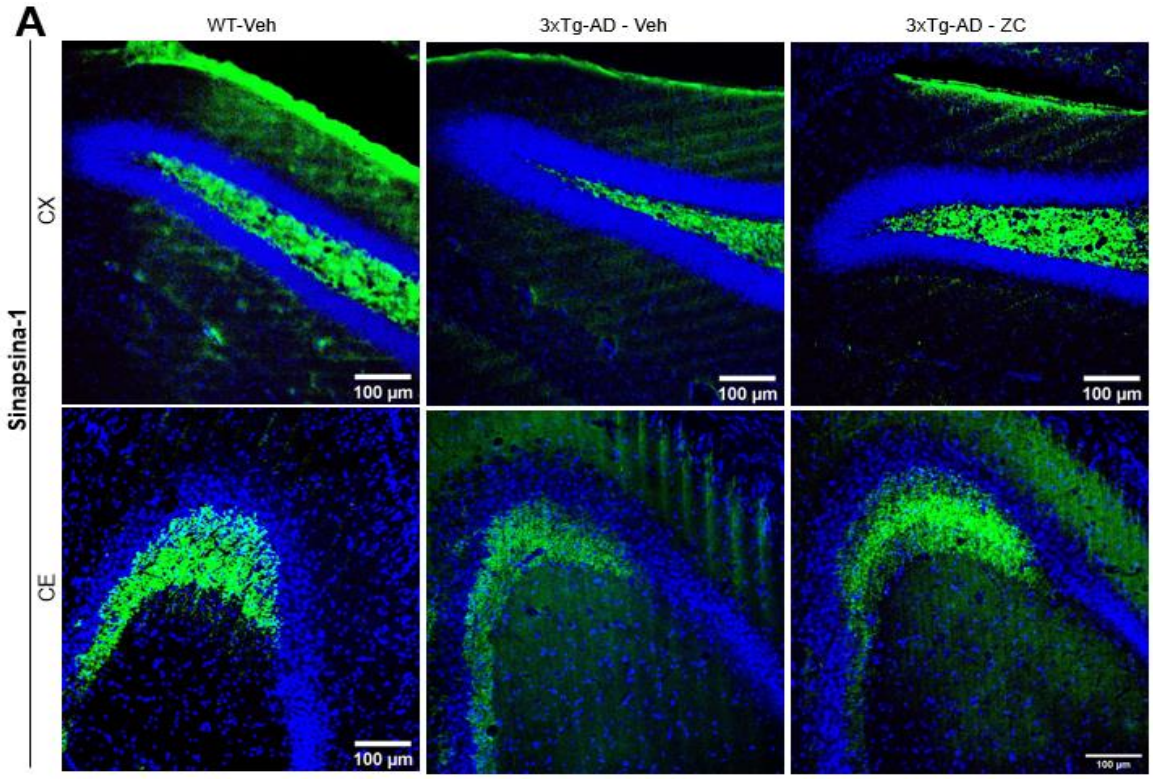
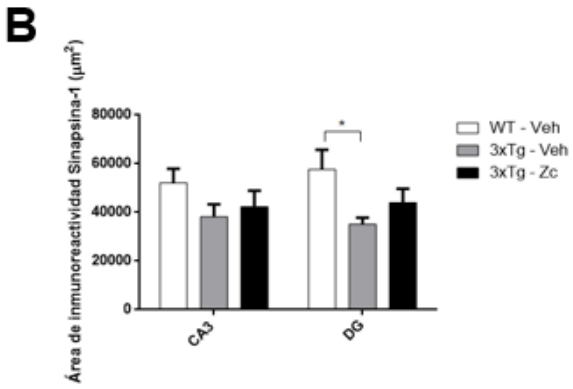


Figura 5-14 Efecto del extracto de *Zanthoxylum caribaeum* en la inmunoreactividad para marcador Sinapsina-1

Micrografías representativas de la inmunoreactividad de Shank 1-2-3 (Verde) obtenidas por microscopía confocal en (A) diferentes regiones del hipocampo (CA1, CA3, GD), (B) Corteza (CX) y Corteza Entorrinal (Ent-Cx). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (Azul)

(C) Análisis comparativo del área de inmunoreactividad entre grupos Los datos están expresados como media ± S.E.M. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de dos vías seguido por test de comparaciones múltiples de Bonferroni para evaluar significancia. *: p<0.05; **: p<0.05 ***: p<0.001 ****p<0.0001 ns: no significativo n=5 animales por grupo. (*) Diferencias entre grupos 3xTg-AD-Veh y WT-Veh (#) Diferencias entre grupos 3xTg-AD-Zc y 3xTg-AD-Veh





5.8 El tratamiento con *Zanthoxylum caribaeum* no tiene efecto sobre la expresión de marcadores de proliferación en el DG de animales 3xTg-AD

La neurogénesis adulta es uno de los procesos que se encuentran más desregulados en la EA. Trabajos previos realizados en el grupo de investigación de Muerte Celular mostraron que la activación de LXRs con agonista sintético GW3965 aumenta el marcaje de +GFAP, +ApoE en la SGZ del DG en el modelo 3xTg-AD, comprobando la colocalización de +ApoE y +Nestina, así como también la colocalización +ApoE y Fosfo-Histona H3 (pHH3s10) coincidiendo con un proceso de proliferación neuronal propiamente dicho, al descartar la proliferación de células gliales (A. G. Sandoval-Hernández et al., 2015). Con el objetivo de evaluar el efecto del extracto de *Zanthoxylum caribaeum* sobre el proceso de neurogénesis en animales 3xTg-AD, se realizó inmunofluorescencia para determinar los niveles de expresión de los marcadores de proliferación Fosfo-Histona 3 fosforilada en serina 10 (pHH3s10) (**Figura 5-15**) y neurogénesis (Nestina) (**Figura 5-16**). El análisis se realizó por conteo de núcleos positivos para +pHH3s10 en la SGZ del DG del hipocampo. Con respecto al marcador de proliferación pHH3s10, se observó que los animales 3xTg-AD presentan una reducción de células +Ph3310 con respecto a animales WT-Littermates, lo que ya se había descrito extensamente, y se ha asociado con el proceso neurodegenerativo. Adicionalmente, se encontró un aumento en el número de células +pHH3s10 en el DG de animales 3xTg-AD tratados con el extracto con respecto a animales 3xTg-AD Veh. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas. Para el caso del marcador Nestina.

Figura 5-15 Efecto de *Zanthoxylum caribaeum* sobre el número de células proliferantes en la SGZ del DG

(A) Micrografías representativas de la inmunoreactividad de pH3s10 (verde) obtenidas por microscopía confocal en el giro dentado del hipocampo **(B)** Análisis comparativo de conteo de núcleos +pH3s10 entre grupos Los datos están expresados como media ± S.E.M. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de dos vías seguido por test de comparaciones múltiples de Bonferroni para evaluar significancia. *: $p<0.05$; **: $p<0.05$ ***: $p<0.001$ ****$p<0.0001$ ns: no significativo n=5 animales por grupo. (*) Diferencias entre grupos 3xTg-AD-Veh y WT-Veh (#) Diferencias entre grupos 3xTg-AD-Zc y 3xTg-AD-Veh

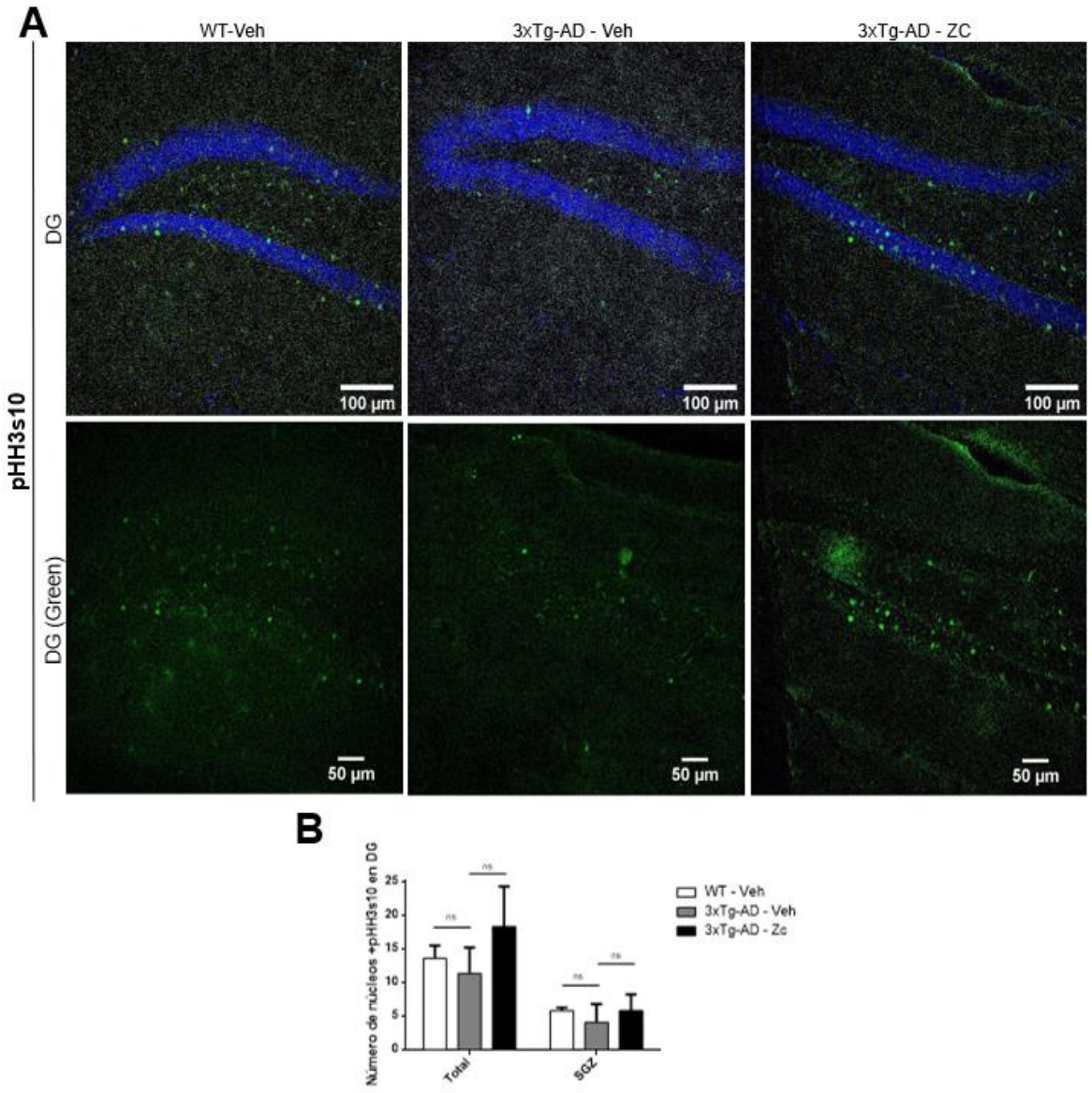
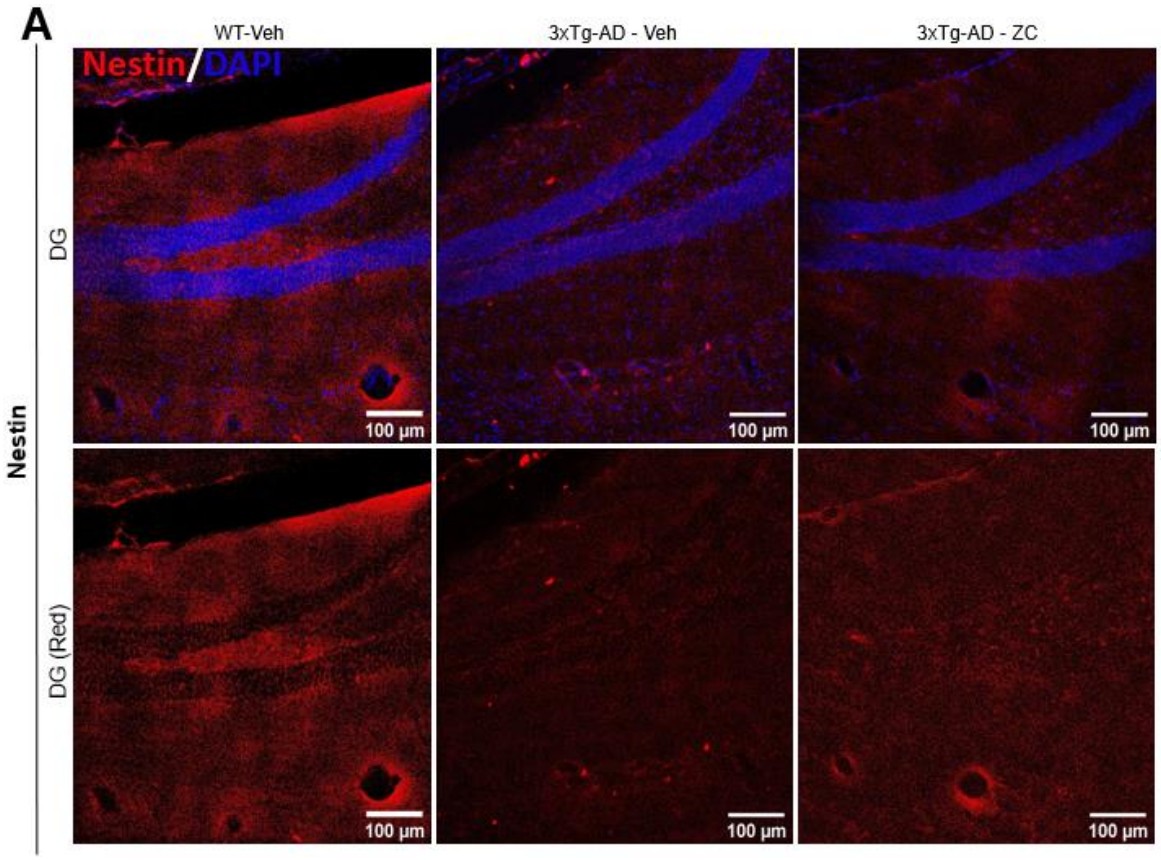
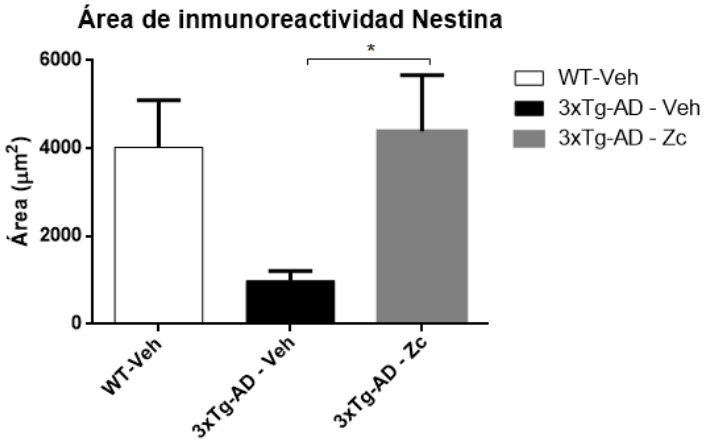


Figura 5-16 Efecto de *Zanthoxylum caribaeum* sobre la inmunoreactividad +Nestin en la SGZ del DG

(A) Micrografías representativas de la inmunoreactividad +Nestin (Rojo) obtenidas por microscopía confocal en el giro dentado del hipocampo **(B)** Análisis comparativo del área de inmunoreactividad entre grupos. Los datos están expresados como media ± S.E.M. Los análisis estadísticos fueron realizados por ANOVA seguido de un test de comparaciones múltiples de t-student. *: p<0.05; **: p<0.05 ***: p<0.001 ****p<0.0001 ns: no significativo

n=5 animales por grupo. (*) Diferencias entre grupos 3xTg-AD-Veh y WT-Veh (#) Diferencias entre grupos 3xTg-AD-Zc y 3xTg-AD-Veh





5.9 Efecto de un tratamiento con dosis 50 mg/kg/día del extracto de *Zanthoxylum caribaeum* sobre los marcadores patológicos de la EA

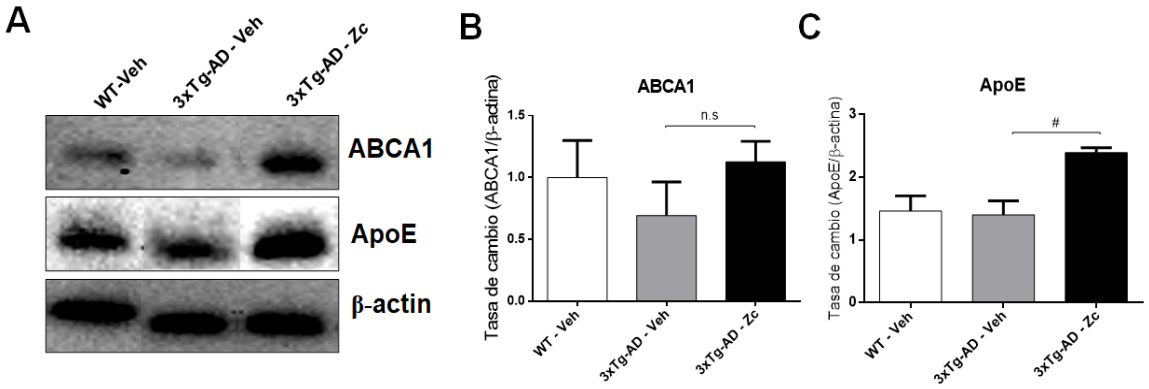
Teniendo en cuenta que el tratamiento de 25 mg/kg/día con extracto etanólico de raíz de *Zanthoxylum caribaeum* en el modelo 3xTg-AD tuvo efecto sobre la mejoría comportamental evidenciada en el desempeño durante la prueba de retención y en los patrones de navegación durante la prueba de aprendizaje, pero también a nivel histopatológico sobre la reducción de astrogliosis, microgliosis y el marcaje de la proteína tau hiperfosforilada; se decidió realizar un tratamiento con una dosis mayor de 50 mg/kg/día administrada por vía oral durante 12 semanas en animales de 12 meses de edad. El análisis comportamental realizado en este grupo experimental hace parte de los resultados de otra tesis de maestría (Guio, 2021) indica que los cambios comportamentales son significativos y tendientes a una mejoría cognitiva tanto en la prueba de aprendizaje como en la retención (datos no mostrados en este trabajo). Sin embargo, las muestras obtenidas fueron utilizadas para responder preguntas de investigación en esta tesis respecto a los efectos del extracto etanólico de *Zanthoxylum caribaeum.* Se obtuvieron lisados proteicos de corteza cerebral e hipocampo usados en Western Blot para investigar los niveles de expresión de los marcadores ABCA1, ApoE, Iba-1, proteínas sinápticas como Sinapsina-1 y PSD-95, además de la activación de la vía PI3K/AKT con el marcaje de AKT Total (tAKT) y AKT activo (p-AKT).

Inicialmente, se evaluó la expresión de los principales blancos transcripcionales de la activación de LXR; ABCA1 y ApoE. Debido a las restricciones generadas por la pandemia derivada de la enfermedad ocasionada por el virus SARS-CoV-2 se limitó el tiempo de trabajo y la importación de anticuerpos y reactivos, por lo cual en este trabajo se mostrarán únicamente los resultados obtenidos en lisados de corteza cerebral.

Inicialmente se observa que el tratamiento con dosis de 50 mg/kg/día aumenta la expresión de ApoE de manera estadísticamente significativa en animales 3xTg-AD tratados con el extracto en comparación con animales 3xTg-AD tratados con vehículo.

Figura 5-17 El extracto de *Zanthoxylum caribaeum* incrementa los niveles de ABCA1 y ApoE en corteza

A. Imágenes representativas de los Western Blot de ABCA1, ApoE y β-actina en corteza de animales 3xTg-AD y WT-Littermates tratados con vehículo o *Z caribaeum* **B.** Cuantificación por densitometría del ensayo de Western Blot para (B) ABCA1 y (C) APOE las muestras fueron normalizadas contra la señal de actina y expresadas como tasa de cambio. Los datos son expresados como la media ±S.E.M. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de una vía seguido de prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni n=4 animales por grupo ns: no significativo *: p<0.05; **: p<0.05 ***: p<0.001 ****p<0.0001 ns: no significativo n=5 animales por grupo. (*) Diferencias entre grupos 3xTg-AD-Veh y WT-Veh (#) Diferencias entre grupos 3xTg-AD-Zc y 3xTg-AD-Veh

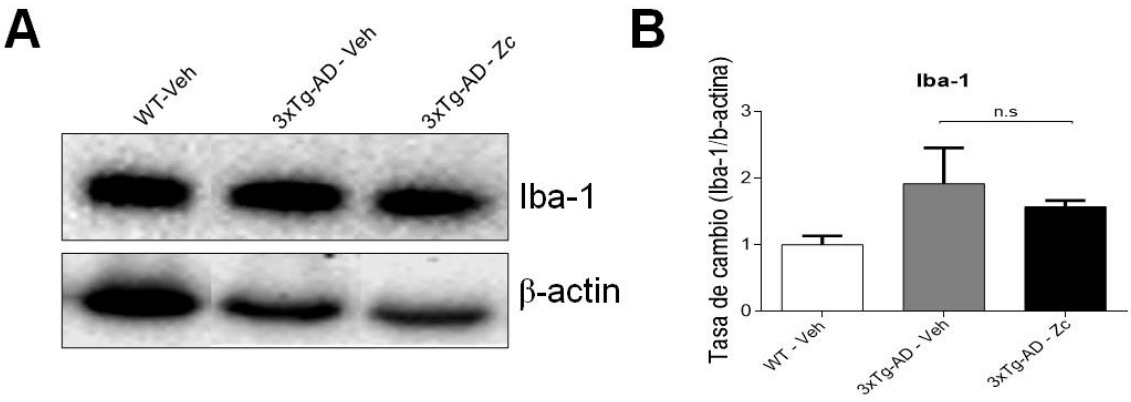


Debido a que en el análisis histopatológico con una dosis de 25 mg/kg/día se observó una reducción de la microgliosis, se evaluó este mismo efecto en animales tratados con una dosis mayor de 50 mg/kg/día. Se investigó la expresión del marcador de microglía Iba-1 por Western Blot. En el análisis no se observan cambios significativos en la expresión de este marcador, aunque se detecta una tendencia a la reducción de su expresión en animales 3xTg-AD tratados con extracto de *Zanthoxylum caribaeum.*

Figura 5-18 El extracto de *Zanthoxylum caribaeum* no tiene efecto en el marcaje para Iba-1 en corteza

(A). Imágenes representativas de los Western Blot de Iba-1 y β-actina en corteza de animales 3xTg-AD y WT-Littermates tratados con vehículo o *Z caribaeum* **(B)**. Cuantificación por densitometría del ensayo de Western Blot, las muestras fueron

normalizadas contra la señal de actina y expresadas como tasa de cambio. Los datos son expresados como la media ±S.E.M. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de una vía seguido de prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni n=4 animales por grupo ns: no significativo *: p<0.05; **: p<0.05 ***: p<0.001 ****p<0.0001 ns: no significativo n=5 animales por grupo. (*) Diferencias entre grupos 3xTg-AD-Veh y WT-Veh (#) Diferencias entre grupos 3xTg-AD-Zc y 3xTg-AD-Veh



Adicionalmente, se quiso evaluar el efecto de la dosis de 50 mg/kg día en la expresión de proteínas sinápticas. Se observa que los animales tratados con *Zanthoxylum caribaeum* presentan una tendencia a incrementar el nivel de expresión de proteínas sinápticas como PSD-95 y Sinapsina-1 en corteza. Sin embargo, estos cambios no son estadísticamente significativos.

Figura 5-19 El extracto de raíz de *Zanthoxylum caribaeum* aumenta la expresión de PSD-95 en corteza

(A). Imágenes representativas de los Western Blot de PSD-95 y β-actina en corteza de animales 3xTg-AD y WT-Littermates tratados con vehículo o *Z caribaeum* **(B)**. Cuantificación por densitometría del ensayo de Western Blot, las muestras fueron normalizadas contra la señal de actina y expresadas como tasa de cambio. Los datos son expresados como la media ±S.E.M. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de una vía seguido de prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni n=4 animales por grupo ns: no significativo

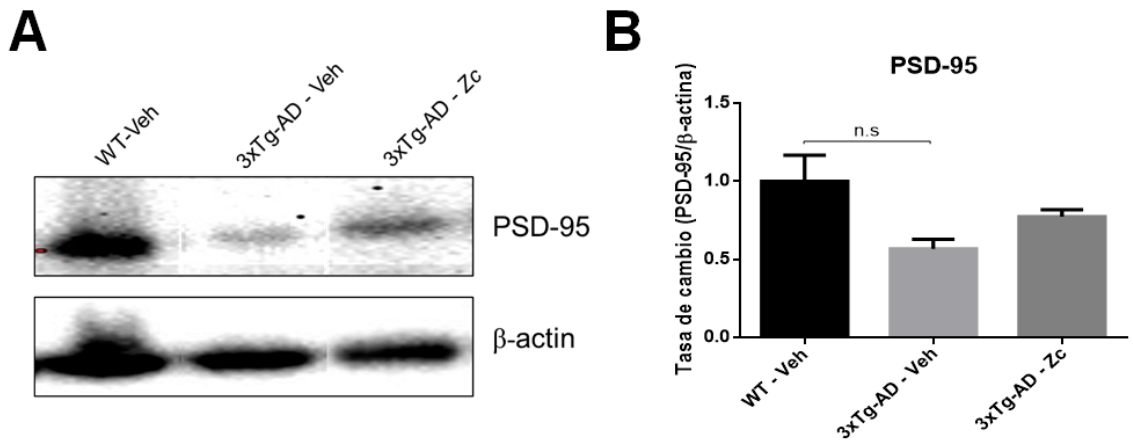
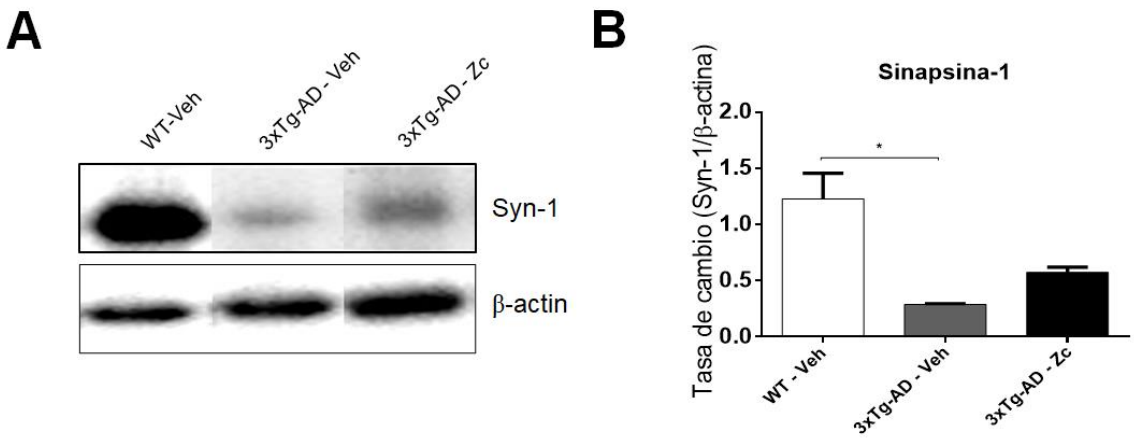


Figura 5-20 El extracto de raíz de *Zanthoxylum caribaeum* aumenta la expresión de Sinapsina-1 en corteza

(A). Imágenes representativas de los Western Blot de Sinapsina-1 (Syn-1) y β-actina en corteza de animales 3xTg-AD y WT-Littermates tratados con vehículo o *Z caribaeum* (**B).** Cuantificación por densitometría del ensayo de Western Blot de la banda correspondiente a 91 kDa., las muestras fueron normalizadas contra la señal de actina y expresadas como tasa de cambio. Los datos son expresados como la media ±S.E.M. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de una vía seguido de prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni n=4 animales por grupo ns: no significativo

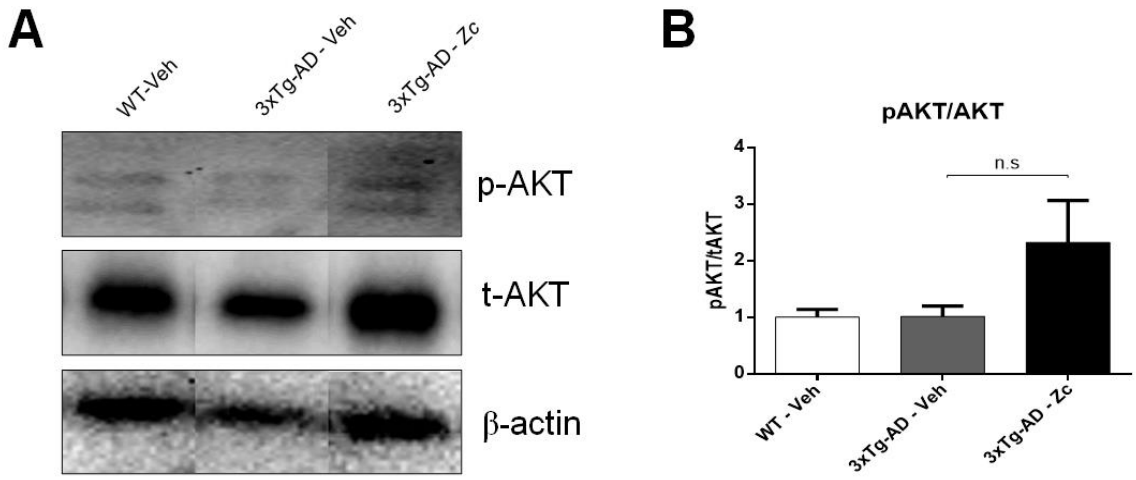


5.10 El tratamiento con extracto de raíz de *Zanthoxylum caribaeum* está implicado en la activación de la vía PI3K/Akt en modelo triple transgénico de la EA.

Para evaluar si la mejoría cognitiva se correlaciona con la activación de la vía PI3K/Akt, se evaluó la expresión de AKT total y AKT fosforilado por medio de Western Blot

Figura 5-21 El extracto de *Zanthoxylum caribaeum* incrementa los niveles de AKT fosforilado (p-AKT) en corteza

(**A).** Imágenes representativas de los Western Blot de p-AKT, AKT y β-actina en corteza de animales 3xTg-AD y WT-Littermates tratados con vehículo o *Zanthoxylum caribaeum* **(B).** Cuantificación por densitometría del ensayo de Western Blot, las muestras fueron normalizadas contra la señal de actina y expresadas como tasa de cambio. Los datos son expresados como la media ±S.E.M. El análisis estadístico fue realizado por ANOVA de una vía seguido de prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni n=4 animales por grupo ns: no significativo.



6. Análisis de Resultados

El estudio de extractos provenientes de especies vegetales como agentes farmacológicos para el tratamiento de diversas enfermedades neurodegenerativas como la EA, se justifica por su riqueza en metabolitos secundarios ampliamente estudiados y caracterizados en algunas especies vegetales como las encontradas en el género *Rutaceae,* particularmente en raíz de la especie *Zanthoxylum caribaeum*. Esto ha sido posible gracias al desarrollo de modelos celulares y animales como el 3xTg-AD, que reproduce muchas de las características fenotípicas de la EA como la presencia de placas amiloides y ovillos neurofibrilares, neuroinflamación, disfunción sináptica y déficit cognitivo, entre otras, las cuales pueden ser evaluadas con modelos experimentales.

El extracto etanólico crudo de *Zanthoxylum caribaeum* ha sido parcialmente caracterizado en otros trabajos de investigación en trabajos colaborativos entre el Grupo de Investigación en Química de Productos Naturales Bioactivos (QUIPRONAB) y el Grupo de Investigación en Muerte Celular. Se observa que el extracto etanólico de raíz de *Zanthoxylum caribaeum* presenta una variedad de actividades biológicas con potencial farmacológico promisorio en la terapéutica de la EA; como (a) actividad agonista del receptor nuclear LXRβ (b) actividad inhibidora de acetil y butiril colinesterasas, (c) actividad antiagregante de Aβ, y (d) actividad captadora de radicales libres. Por lo anterior, el presente trabajo se enfocó en estudiar el efecto in vivo del extracto etanolico de la raíz de *Zanthoxylum caribaeum* sobre el déficit cognitivo, marcadores histopatológicos, procesos inflamatorios de la microglía y astrocitos, así como posibles cambios en el linaje de mielina y marcadores sinápticos en el animal 3xTg-AD. Así mismo, se están desarrollando en la actualidad estudios paralelos en tesis de maestría en la cuales se ha generado la caracterización del perfil fitoquímico del extracto (Bustamante, 2021; Bustos, 2021).

Se decidió realizar un tratamiento farmacológico con el extracto a una dosis baja de 25 mg/kg/día por vía oral (gavage) en el modelo animal 3xTg-AD de doce meses de edad, ya

que el modelo 3xTg-AD presenta depósito de placas amiloides y ovillos neurofibrilares que se desarrollan con mayor velocidad entre los 12 y los 15 meses de edad. El diseño experimental consta de un tratamiento de largo término de 18 semanas incluyendo los respectivos controles de animales 3xTg-AD y WT (littermates) tratados con vehículo. La dosis escogida obedece a la consideración de varios factores; en primer lugar, estudios previos del grupo de investigación mostraron que el extracto no presenta toxicidad a las dosis seleccionadas a concentraciones menores de 100 mg/ml en cultivos celulares neuronales, segundo, las recomendaciones del Handbook de excipientes (Rowe, Sheskey, & Owen, 2006), y tercero, experiencias previas de investigación en productos naturales.

Al finalizar el tratamiento con dosis de 25 mg/kg/día en el modelo 3xTg-AD se realizó una evaluación de los cambios cognitivos por MWM. Inicialmente no se observaron cambios significativos en la prueba de aprendizaje, donde se evidenció que los animales realizan un nado direccionado hacia la plataforma pero a una menor velocidad (**Figura 5-1C**), donde se encontró que los animales 3xTg-AD tratados reducen su velocidad de nado, se descartó la presencia de alteraciones visuales durante la prueba visible entre los grupos (**Figura 5-3D**), esta reducción de la velocidad sugiere que hay efectos diferenciales entre los grupos de animales 3xTg-AD tratados y no tratados. Debido a que se observó la búsqueda guiada durante la prueba de aprendizaje, se decidió analizar los patrones de nado, o estrategias de navegación (**Figura 5-2**) observando una tendencia de los animales tratados hacia el uso de estrategias espaciales a lo largo del desarrollo de la prueba, sugiriendo que el extracto está generando cambios comportamentales, los cuales fueron significativos en la prueba de retención (**Figura 5-3 A,B,C**), en la cual se observó mayor tiempo de permanencia en el cuadrante de la plataforma de ratones 3xTg-AD tratados con el extracto con respecto a animales 3xTg-AD tratados con vehículo.

La reducción de la velocidad de nado y el comportamiento de navegación espacial observado durante la prueba de aprendizaje sugieren que el tratamiento con el extracto podría tener potenciales efectos ansiolíticos. El entendimiento y análisis de estos cambios comportamentales requiere de diseños experimentales distintos y pruebas de comportamiento específicas (laberinto elevado plus, test de interacción social, test de campo abierto) (Lezak, Missig, & Carlezon, 2017), que se deben realizar como perspectivas.

La mejoría cognitiva ha sido extensamente reportada en animales transgénicos de EA tratados con agonistas de receptores LXR y RXR, sin embargo, teniendo en cuenta las características del extracto, el cual presenta una composición compleja no se puede descartar que el extracto presente múltiples blancos de acción en la neuroprotección. Con el fin de reconocer los mecanismos moleculares implicados en los cambios comportamentales, se realizó la evaluación por inmunofluorescencia de los blancos transcripcionales de LXR, marcadores histopatológicos, marcadores de inflamación, proteínas sinápticas y del linaje de mielina.

Respecto a los marcadores histopatológicos, se observó una reducción de la inmunoreactividad para el antígeno 6E10 en animales 3xTg-AD tratados con el extracto de *Zanthoxylum caribaeum* con respecto a animales 3xTg-AD tratados con vehículo. Este cambio fue estadísticamente significativo en la corteza **(Figura 5-4).** Los posibles mecanismos involucrados en la reducción de la patología amiloide mediada por el extracto en el modelo 3xTg-AD son dos: en primer lugar nuestro grupo de investigación y otros han demostrado que el incremento de la actividad LXR en el cerebro disminuye la carga amiloide a través de un mecanismo dependiente de ApoE (Bonet-Costa, 2016; Cramer et al., 2012; Jiang et al., 2008). Para demostrar que hay un incremento de la actividad de LXRs en el cerebro de animales 3xTg-AD tratados con respecto a los no tratados, estudiamos la inmunoreactividad de ApoE en animales tratados con dosis de 25 mg/kg/día por inmunofluorescencia y la expresión de ABCA1 y ApoE de animales tratados con dosis de 50 mg/kg/día por Western Blot. Inicialmente observamos que los animales tratados con la dosis de 25 mg/kg/día incrementaron la inmunoreactividad para ApoE, este cambio presentó significancia estadística en la corteza entorinal (**Figura 5-10**). Con respecto a los animales tratados con la dosis de 50 mg/kg/día, observamos que tanto ApoE como ABCA1 se encuentran incrementados en los animales tratados (**Figura 5-17**), lo que indica que el extracto presenta moléculas agonistas de LXR de las cuales por lo menos una tiene la capacidad de atravesar la Barrera Hematoencefálica (BHE) y activar la función de los LXRs en el cerebro a nivel transcripcional. Esto confirmaría adicionalmente el mecanismo ApoE dependiente de la reducción de Aβ (Huynh, Davis, Ulrich, & Holtzman, 2017; Jiang et al., 2008; Wisniewski & Drummond, 2020). Adicionalmente, en estudios in vitro realizados en paralelo en el grupo de investigación, se sabe que el extracto contiene moléculas inhibidoras del proceso de agregación de Aβ, las cuales también podrían estar

involucradas en la reducción de la carga amiloidea (datos no publicados) (Bustamante, 2021).

Respecto a los ovillos neurofibrilares, se observó una reducción en el área de inmunoreactividad para el antígeno AT8 (fosforilación de tau en residuos Ser202, Thr 205) en animales tratados con el extracto de *Zanthoxylum caribaeum (***Figura 5-5**). La patología Tau tiene alta correlación con el desempeño cognitivo en humanos (Bejanin et al., 2017; Rentz et al., 2017) y en el modelo animal 3xTg-AD (Belfiore et al., 2019), y por lo tanto se puede postular que la reducción de la patología tau estaría involucrada en la mejoría cognitiva. Los mecanismos moleculares involucrados en la reducción de la fosforilación de Tau no son claros, sugerimos que es la regulación asociada a la activación de AKT como GSK-3β una de las vías probables de la reducción de la fosforilación de Tau (Kitagishi, Nakanishi, Ogura, & Matsuda, 2014), o la presencia de moléculas con actividad inhibitoria de kinasas de tau como el alcaloide β-carbolina ampliamente distribuido en una variedad de especies vegetales incluyendo las familias *Apocynaceae, Elaeagnaceae, Leguminosae, Passifloraceae*, y más específicamente las especies *Chrysophyllum lacourtianum, Catharanthus roseus, Lolium perenne, Strychnos johnsonii, Strychnos potatorum*, y *Festuca arundinacea* (Moura, Franc, Pe, Boeira, & Saffi, 2007) , algunos de los cuales ya se han reportado en modelos in vitro como inhibidora de la kinasa DYRK1, involucrada en la fosforilación de tau y la formación de ovillos neurofibrilares (Frost et al., 2011). La reducción de la fosforilación de tau puede estar relacionada con procesos de crecimiento neurítico y transporte axonal (Johnson & Stoothoff, 2004) y la función mitocondrial en términos de su transporte y estabilización dentro de la célula (Pérez, Jara, Quintanilla, & Frye, 2018; Shahpasand et al., 2012), que explicarían en parte la mejoría cognitiva asociada a la administración del extracto. Adicionalmente, el efecto del extracto sobre la reducción de patología amiloide impacta directamente la función de kinasas de tau como CDK5, particularmente del complejo p25/CDK5 (S. L. Liu et al., 2016). Estos hallazgos sugieren la necesidad de investigar la actividad de las kinasas de tau para establecer el mecanismo que subyacen en la reducción de la fosforilación de tau en animales 3xTg-AD tratados con el extracto de raíz de *Zanthoxylum caribaeum*.

Respecto a los marcadores inflamatorios, se observó una reducción de la astrogliosis (**Figura 5-6**), así como también de la microgliosis (**Figura 5-8**), ambos asociados a procesos proinflamatorios en el cerebro de animales 3xTg-AD y en humanos con EA

(Kinney et al., 2018). Se observa que animales 3xTg-AD tratados con el extracto de *Zanthoxylum caribaeum* presentaron una astrogliosis y microglíosis. Este efecto se puede explicar a través del mecanismo agonistas de LXR del extracto, el cual ha sido establecido por varios grupos de investigación incluyendo el nuestro (Kang & Rivest, 2012; Liang et al., 2004; Wu et al., 2007), mostrando que la activación de LXR produce reducción de la astrogliosis en el modelo animal 3xTg-AD (A. G. Sandoval-Hernández et al., 2015). El mecanismo antiinflamatorio de los receptores nucleares, incluyendo el LXR, consiste en la transrepresión de genes proinflamatorios, la trans-represión hace referencia a todos los procesos de regulación de la expresión génica independientes de la unión al DNA, por este mecanismo el factor de trascripción NF-κB es inhibido(Gillespie et al., 2015; Thomas et al., 2018). Adicionalmente, se ha demostrado que el efecto antinflamatorio de la activación de LXR es independiente de la actividad fagocítica de la microglía y la tasa de limpieza o eliminación del péptido Aβ (Fitz, Nam, Koldamova, & Lefterov, 2019; Zelcer et al., 2007) posiblemente por un efecto sobre la expresión de genes que codifican para receptores implicados en esta función (*Trem2*, *tyrobp*, *Apoe*) (Nam et al., 2016). En este estudio, como en el desarrollado por Sandoval y cols (A. G. Sandoval-Hernández et al., 2015) y en otros (Liang et al., 2004; Mcvoy, Oughli, & Oh, 2015; Wu et al., 2007), se evidencia una reducción de la astrogliosis y la neuroinflamación de acuerdo con un patrón regional, observándose cambios más marcados en el hipocampo, lo cual concuerda con el desarrollo de la patología en el modelo 3xTg-AD. Los resultados obtenidos apuntan hacia un posible efecto antiinflamatorio del extracto de *Zanthoxylum caribaeum.* Este efecto ha sido reportado anteriormente como consecuencia de la activación de LXR en el modelo animal 3xTg-AD con agonistas sintéticos de LXR como el GW3965 (Mcvoy et al., 2015; A. G. Sandoval-Hernández et al., 2015; Wu et al., 2007) y de RXR como el bexaroteno (Muñoz-Cabrera et al., 2019; Saijo, Crotti, & Glass, 2013; Wood, 2020).Finalmente, se evidenciaron cambios morfológicos en la microglía activa **(Figura 5-9)** que evidencian una tendencia hacia la reducción de la reactividad de la microglía en animales tratados con el extracto, lo que se puede explicar como efecto de la activación de LXRs y que ha sido previamente reportado (Liang et al., 2004; Muñoz-Cabrera et al., 2019; Terwel et al., 2011; Zhang-Gandhi & Drew, 2007). El efecto observado por inmunofluorescencia fue comprobado por Western Blot en corteza de animales tratados con una dosis de 50 mg/kg/día, y se observa una tendencia a la disminución de la neuroinflamación en animales 3xTg-AD tratados con respecto a 3xTg-AD tratados con vehículo.

Respecto al estatus de los marcadores del linaje de mielina, se encontró un aumento de la inmunoreactividad para Olig2, un marcador de células proliferantes y de oligodendrocitos maduros (MBP), respectivamente, en animales 3xTg-AD tratados con el extracto de *Zanthoxylum caribaeum* con respecto a animales 3xTg-AD tratados con vehículo (**Figura 5-11** y **Figura 5-12**). Los cambios en la expresión de estos marcadores como resultado de la administración del extracto se podrían atribuir a la activación de LXR, teniendo en cuenta que anteriormente se ha reportado el efecto de la actividad de LXR sobre la expresión de MBP a nivel de mRNA en modelo murino, concluyendo que la activación de LXR puede aumentar la transcripción de proteínas relacionadas con la mielinización de una forma región-dependiente, observando mayor significancia estadística en el sistema nervioso central, particularmente en cerebelo y cuerpo calloso (Shackleford, Grenier, Habib, Massaad, & Meffre, 2017). Adicionalmente, estudios realizados con agonista sintético de RXR (bexaroteno) concluyeron que la activación de este receptor puede modular la expresión de proteínas relacionadas con la mielinización en el modelo 3xTg-AD, incrementando de esta manera los progenitores intermedios y maduros del linaje de mielina. (Santos-Gil, Arboleda, & Sandoval-hernandez, 2021). Las alteraciones en la mielinización han sido descritas en el modelo 3xTg-AD, y se sabe que ocurren en etapas muy tempranas de la EA. Este proceso afecta de manera directa la transmisión sináptica debido a la disrupción de la transmisión de impulsos nerviosos a través del axón (Desai MK, Sudol KL, Janelsins MC, Mastrangelo MA, Frazer ME, 2009). En el presente estudio se observó un aumento de la expresión de proteínas relacionadas con células precursoras de oligodendrocitos (OPCs, por sus siglas en inglés) marcadas con el factor de transcripción Olig2 **Figura 5-11**, lo que sugiere una maduración de células mielinizantes que activan procesos de proliferación y diferenciación a partir de la activación de LXRs. Adicionalmente, se encontró un proceso de remielinización incipiente por medio del marcaje de con MBP donde se observó que el tratamiento con *Z caribaeum* revierte los procesos de desmielinización en corteza entorrinal (**Figura 5-12**). Estos cambios se pueden relacionar con una optimización de la función sináptica debida al aumento de la velocidad de conducción nerviosa y consecuentemente a la mejoría cognitiva observada en la prueba comportamental.

Respecto a la función sináptica no se encontraron cambios significativos, se observó una tendencia del extracto a aumentar la inmunoreactividad para el marcador de la post-

sinapsis Shank 1-2-3 en animales 3xTg-AD tratados con el extracto en comparación con animales 3xTg-AD tratados con vehículo (**Figura 5-13** y **Figura 5-14**). Cuando se evaluó la expresión de Sinapsina-1 y de PSD-95 con una dosis mayor de 50 mg/kg/día no se observaron cambios entre tratamientos (**Figura 5-19 Figura 5-20**). Los resultados sugieren que se deben realizar más análisis incluyendo ensayos electrofisiológicos para determinar el efecto del tratamiento sobre esta función.

Respecto al efecto del extracto sobre la neurogénesis adulta, se encontró un aumento de la inmunoreactividad para células proliferantes en la SGZ del DG en animales tratados con el extracto de *Zanthoxylum caribaeum* con respecto a animales 3xTg-AD tratados con vehículo. Sin embargo, no se observaron cambios en Nestina en la misma región lo cual indicaría que el extracto no presenta un efecto marcado sobre los marcadores de proliferación neuronal propiamente dicha en el modelo animal 3xTg-AD. La marcación con células responsables de la proliferación se puede relacionar con la generación de precursores de oligodendrocitos observada (**Figura 5-11**) para lo cual se requiere una doble marcación +pHH3 s10 +Olig2, que hace parte de las perspectivas del presente trabajo.

En el presente estudio se evaluó la activación de la vía de supervivencia neuronal PI3K/Akt a través de la fosforilación de la proteína AKT (**Figura 5-21**) observándose un aumento en la fosforilación de AKT en animales 3xTg-AD tratados con el extracto de *Zanthoxylum caribaeum,* lo que se relaciona con los efectos conocidos de la activación de la vía PI3K/AKT sobre la regulación negativa de kinasas como GSK-3β(Kitagishi et al., 2014)

Finalmente, este estudio pretende describir el efecto del extracto etanólico de *Zanthoxylum caribaeum* sobre los principales marcadores de la EA en el modelo murino 3xTg-AD. Los cambios observados y reportados pueden atribuirse a la activación de receptores LXR en el Sistema Nervioso Central. Sin embargo, el extracto etanólico crudo de raíz de *Zanthoxylum caribaeum* es rico en moléculas con actividad biológica que incluyen alcaloides variados, lignanos, cumarinas, amidas, flavonoides, terpenos, entre otros (Javier Patino et al., 2012), que pueden incidir en múltiples blancos o dianas de acción.

Los alcaloides presentes en las especies del género son los compuestos más importantes porque son un marcador quimiotaxonómico y se encuentran en abundancia en tronco y raíz (Diéguez-Hurtado et al., 2003). De importancia para el género, se ha reportado la

presencia de dos alcaloides: isoquinolínicos y quinolinas (Javier Patino et al., 2012; Patiño, 2004). Sin embargo, el alcaloide isoquinolínico más estudiado en relación a su potencial como agente terapéutico para la EA es la berberina, que ha sido identificada como potencial anticolinérgico, inhibidor de Monoamino Oxidasa (MAO), así como también antiagregante de amiloide beta y regulador del colesterol(Ahmed et al., 2015; Plazas, Erika, R et al., 2019). Teniendo en cuenta que dos de las cuatro terapéuticas aprobadas para el tratamiento de la EA son alcaloides de origen vegetal como la rivastigmina y la galantamina (Khoury, R., Rajamanickam, J., Grossberg, 2018).

Con relación a los estudios previos sobre la actividad neuroprotectora del extracto etanólico de raíz de *Zanthoxylum caribaeum* se conoce el perfil metabolómico de actividad inhibidora de acetil (206,7 ± 1,3 μg mL^{-1}) y butiril (501,2 ± 1,2 μg mL^{-1}) colinesterasas (Plazas, Erika, R et al., 2019). Adicionalmente, en tesis de maestría en curso se ha comprobado su acción como antiagregante de Aβ, neuroprotector frente a diferentes neurotóxicos y acción antioxidante. Por lo anterior, el extracto etanólico de raíz de *Zanthoxylum caribaeum* se presenta como un agente terapéutico promisorio para el tratamiento de la EA, dada su riqueza fitoquímica y los múltiples blancos de acción de relevancia para la EA en los que puede incidir.

7. Conclusiones y recomendaciones

7.1 Conclusiones

Se describió el efecto de un extracto etanólico de raíz de *Zanthoxylum caribaeum* sobre los principales marcadores fisiopatológicos de la Enfermedad de Alzheimer en virtud de su actividad agonista de LXRs, con potencial uso terapéutico en el modelo animal 3xTg-AD. A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que:

1) La administración del extracto se asoció con una mejoría cognitiva en un tratamiento de 18 semanas de duración con dosis de 25 mg/kg/día.
2) La administración del extracto redujo el marcaje de los dos principales marcadores histopatológicos de la EA, a saber, Amiloide beta (Aβ) y proteína tau hiperfosforilada (p-tau). Este efecto fue más evidente en la reducción de la patología tau, lo cual se puede asociar con la mejoría cognitiva.
3) La administración del extracto redujo la astrogliosis y la neuroinflamación.
4) La administración del extracto incrementó el nivel de expresión de los blancos transcripcionales de LXRs como son ABCA1 y ApoE. Este incremento puede explicar su efecto sobre el comportamiento y la reducción de marcadores histopatológicos de la EA.
5) El tratamiento con el extracto de raíz de *Zanthoxylum caribaeum* no se relacionó con un cambio significativo en la expresión de proteínas sinápticas, se requiere un estudio electrofisiológico para estudiar esta función con más detalle.
6) El tratamiento con extracto etanólico de *Zanthoxylum caribaeum* se relacionó con aumento de la inmunoreactividad para marcadores del linaje de mielina que pueden explicar la mejoría cognitiva observada en el modelo 3xTg-AD.
7) La administración del extracto no se asoció con cambios significativos en el marcaje para células proliferantes en el giro dentado del hipocampo.

8) El extracto de *Zanthoxylum caribaeum* no modula la actividad de la vía de señalización PI3K-AKT, sin embargo, se sugiere aumentar las réplicas biológicas y la dosis del tratamiento para estudiar este efecto con mayor profundidad.

Recomendaciones

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

Evaluar cambios en el perfil transcripcional a nivel de mRNA en animales tratados con extracto etanólico de raíz de *Zanthoxylum caribaeum.*

Evaluar cambios comportamentales asociados al tratamiento con extracto de *Zanthoxylum caribaeum* relacionados con su potencial acción ansiolítica.

Evaluar con mayor profundidad los cambios en el proceso de neurogénesis asociados con el tratamiento con extracto de *Zanthoxylum caribaeum* realizando doble marcación pHH3 s10 Olig2 para evaluar su efecto sobre la mielinización.

Evaluar el efecto protector del extracto de *Zanthoxylum caribaeum* sobre espinas dendríticas en cultivo primario de neuronas hipocampales frente a péptido amiloide beta en su forma oligomérica (oAβ42).

Bibliografía

Adesina, S. . (2005). THE NIGERIAN ZANTHOXYLUM; CHEMICAL AND BIOLOGICAL VALUES. *Afr. J. Traditional*, *2*(3), 282–301.

Ahmed, T., Gilani, A., Abdollahi, M., Daglia, M., Nabavi, S., & Nabavi, S. (2015). Berberine and neurodegeneration: A review of literature. *Pharmacol Rep.*, *67*(5), 970–979.

Alzheimer's Disease International. (2015). *World Alzheimer Report 2015 The Global Impact of Dementia*. London.

Amelio, M. D., Cavallucci, V., Middei, S., Marchetti, C., Pacioni, S., Ferri, A., … Cecconi, F. (2010). Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer ' s disease. *Nat Neurosci.*, *14*(1), 69–76. https://doi.org/10.1038/nn.2709

Anand, A., Patience, A. A., Sharma, N., & Khurana, N. (2017). The present and future of pharmacotherapy of Alzheimer ' s disease : A comprehensive review. *European Journal of Pharmacology*, *815*(October), 364–375. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.09.043

Arboleda G., Cardenas Y., Rodriguez Y., Morales L.C., Matheus L., A. H. (2010). Differential regulation of AKT, MAPK and GSK3β during C2-ceramide-induced neuronal death. *NeuroToxicology*, *31*(6), 687–693.

Association, A. (2018). 2018 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, *14*(3), 367–429. https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.001

Association, A. P. (1995). *DSM-IV Manual diagnóstico y estadístico de las Enfermedades Mentales*.

Barateiro, A., & Fernandes, A. (2014). Temporal oligodendrocyte lineage progression : In vitro models of proliferation, differentiation and myelination. *Biochim Biophys Acta.*, *1843*(9), 1917–1929. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.04.018

Bartus, R. T., Iii, R. L. D., Beer, B., & Lippa, A. S. (1982). *The Cholinergic Hypothesis of Geriatric Memory Dysfunction*. *217*(4558), 408–417.

Bartzokis, George; Lu, Po H; Mintzd, J. (2008). Human brain myelination and amyloid beta deposition in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, *3*(2), 122–125.

Beez-Becerra, C., Filipello, F., Sandoval, A. ., Arboleda, H., & Arboleda, G. (2018). Liver X Receptor Agonist GW3965 Regulates Synaptic Function upon Amyloid Beta Exposure in Hippocampal Neurons. *Neurotox Res.*, *33*(3), 569–579.

Behrendt, G., Baer, K., Buffo, A., Curtis, M. A., Faull, R. L., Rees, M. I., … Dimou, L. (2013). Dynamic Changes in Myelin Aberrations and Oligodendrocyte Generation in Chronic Amyloidosis in Mice and Men. *Glia*, *286*, 273–286. https://doi.org/10.1002/glia.22432

Bejanin, A., Schonhaut, D. R., Joie, R. La, Kramer, J. H., Baker, S. L., Sosa, N., … Rabinovici, G. D. (2017). Tau pathology and neurodegeneration contribute to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Brain*, *140*, 3286–3300. https://doi.org/10.1093/brain/awx243

Belfiore, R., Rodin, A., Ferreira, E., Velazquez, R., Branca, C., Caccamo, A., & Oddo, S. (2019). Temporal and regional progression of Alzheimer's disease - like pathology in 3xTg - AD mice. *Aging Cell*, *18*(1), 1–13. https://doi.org/10.1111/acel.12873

Bellucci, A., Westwood, A. J., Ingram, E., Casamenti, F., Goedert, M., & Spillantini, M. G. (2004). Induction of Inflammatory Mediators and Microglial Activation in Mice Transgenic for Mutant Human P301S Tau Protein. *The American Journal of Pathology*, *165*(5), 1643–1652. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63421-9

Bliss, TVP; Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.*, *232*, 331–356.

Bonet-Costa, V. et al. (2016). Clearing Amyloid-β through PPAR γ/ApoE Activation by Genistein Is a Treatment of Experimental Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, *51*(3), 701–711.

Bu, G. (2009). Apolipoprotein e and its receptors in Alzheimer's disease: Pathways, pathogenesis and therapy. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(5), 333–344. https://doi.org/10.1038/nrn2620

Bustamante, A. (2021). *Búsqueda de principios activos con potencial neuroprotector para el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer a partir de la especie Zanthoxylum caribaeum (Rutaceae) TESIS EN CURSO*. Universidad Nacional de Colombia Maestría en Neurociencias.

Bustos, A. (2021). *Búsqueda de agonistas LXR en plantas colombianas con potencial terapéutico para la Enfermedad de Alzheimer TESIS EN CURSO*. Universidad Nacional de Colombia Departamento de Química. Maestría en Ciencias - Bioquímica.

Butterfield, D. a, & Pocernich, C. B. (2003). The glutamatergic system and Alzheimer's disease: therapeutic implications. *CNS.Drugs*, *17*(1172–7047), 641–652. https://doi.org/10.2165/00023210-200317090-00004

Cai, Z., & Xiao, M. (2016). Oligodendrocytes and Alzheimer ' s disease. *International Journal of Neuroscience*, *126*(2), 97–104. https://doi.org/10.3109/00207454.2015.1025778

Craig, L. A., Hong, N. S., & McDonald, R. J. (2011). Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *35*(6), 1397–1409. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.03.001

Cramer, P. E., Cirrito, J. R., Wesson, D. W., Lee, C. Y. D., Karlo, J. C., Zinn, A. E., … Landreth, G. E. (2012). ApoE-directed therapeutics rapidly clear β-amyloid and reverse deficits in AD mouse models. *Science*, *335*(6075), 1503–1506. https://doi.org/10.1126/science.1217697

Cuca, L. E., & Taborda, M. E. (2007). METABOLITOS AISLADOS DE Zanthoxylum rhoifolium. *Rev Colom Quim*, *36*(1), 5–12.

Desai MK, Sudol KL, Janelsins MC, Mastrangelo MA, Frazer ME, B. W. (2009). Triple-transgenic Alzheimer's disease mice exhibit region-specific abnormalities in brain myelination patterns prior to appearance of amyloid and tau pathology. *Glia*, *57*(1), 54–65.

Dey, A., Bhattacharya, R., Mukherjee, A., & Pandey, D. K. (2017). Natural products against Alzheimer's disease: Pharmaco-therapeutics and biotechnological interventions. *Biotechnology Advances*, *35*(2), 178–216. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.12.005

Diéguez-Hurtado, R., Garrido-Garrido, G., Prieto-González, S., Iznaga, Y., González, L., Molina-Torres, J., … Marcotullio, M. C. (2003). Antifungal activity of some Cuban Zanthoxylum species. *Fitoterapia*, *74*(4), 384–386. https://doi.org/10.1016/S0367-326X(03)00048-0

Donkin, J. J., Stukas, S., Hirsch-Reinshagen, V., Namjoshi, D., Wilkinson, A., May, S., … Wellington, C. L. (2010). ATP-binding cassette transporter A1 mediates the beneficial effects of the liver X receptor agonist GW3965 on object recognition memory and amyloid burden in amyloid precursor protein/presenilin 1 mice. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(44), 34144–34154. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.108100

Espo, M. S., Piatti, C., Laplagne, D. A., Morgenstern, A., Ferrari, C. C., Pitossi, F. J., & Schinder, A. F. (2005). Neuronal Differentiation in the Adult Hippocampus Recapitulates Embryonic Development. *J Neurosci.*, *25*(44), 10074–10086. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3114-05.2005

Essa, M. M., Vijayan, R. K., Braidy, N., Guillemin, G. J., & Berry, B. (2012). Neuroprotective Effect of Natural Products Against Alzheimer ' s Disease. *Neurochem Res*, *37*, 1829–1842. https://doi.org/10.1007/s11064-012-0799-9

Fitz, N. F., Nam, K. N., Koldamova, R., & Lefterov, I. (2019). Therapeutic targeting of nuclear receptors, liver X and retinoid X receptors, for Alzheimer's disease. *British Journal of Pharmacology*, *176*(18), 3599–3610. https://doi.org/10.1111/bph.14668

Frost, D., Meechoovet, B., Wang, T., Gately, S., Giorgetti, M., & Dunckley, T. (2011). β-Carboline Compounds , Including Harmine, Inhibit DYRK1A and Tau Phosphorylation at Multiple Alzheimer's Disease-Related Sites. *PLoS One.*, *6*(5), 1–9. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019264

Garre-Olmo, J. (2018). Epidemiología de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias. *REV NEUROL*, *66*(11), 377–386.

Giacobini, E., & Gold, G. (2013). Alzheimer disease therapy — moving from amyloid - β to tau. *Nature Publishing Group*, *9*(12), 1–10. https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.223

Gillespie, M. A., Gold, E. S., Ramsey, S. A., Podolsky, I., Aderem, A., & Ranish, J. A. (2015). An LXR – NCOA 5 gene regulatory complex directs inflammatory crosstalk-dependent repression of macrophage cholesterol efflux. *EMBO J.*, *34*(9), 1244–1258.

Gipson, C. D., & Olive, M. F. (2017). Structural and functional plasticity of dendritic spines – root or result of behavior ? *Genes Brain Behav*, *16*(1), 101–117. https://doi.org/10.1111/gbb.12324

Glenner, G. G., & Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *120*(3), 885–890. https://doi.org/10.1016/S0006-291X(84)80190-4

Gonatas, NK; Anderson, W; Evangelista, I. (1967). The contribution of altered synapses in the senile plaque: an electron microscopic study in Alzheimer´s dementia. *J Neuropathol Exp Neurol.*, *1*, 25–39.

Gralle, M., Oliveira, C. L. P., Guerreiro, L. H., McKinstry, W. J., Galatis, D., Masters, C. L., … Ferreira, S. T. (2006). Solution conformation and heparin-induced dimerization of the full-length extracellular domain of the human amyloid precursor protein. *Journal of Molecular Biology*, *357*(2), 493–508. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.12.053

Guio, G. (2021). *EVALUACION DEL POTENCIAL FITOTERAPEUTICO DE DOS EXTRACTOS DE ZANTHOXYLUM EN EL MODELO MURINO TRIPLE-TRANSGENICO DE LA ENFERMEDAD DEL ALZHEIMER*. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina. Maestría en Fisiología.

Hattum, H; Waldmann, H. (2014). Biology-oriented synthesis: harnessing the power of evolution. *J. Am. Chem. Soc.*, *136*, 11853–11859.

Hoxhaj, Gerta, Brendan D, M. (2019). The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*, *20*, 74–88.

Huang, C. (2014). Natural modulators of liver X receptors. *Journal of Integrative Medicine*, *12*(2), 76–85. https://doi.org/10.1016/S2095-4964(14)60013-3

Hussain, G., Rasul, A., Anwar, H., Aziz, N., Razzaq, A., & Wei, W. (2018). Role of Plant Derived Alkaloids and Their Mechanism in Neurodegenerative Disorders. *Int J Biol Sci*, *14*(3), 341–357. https://doi.org/10.7150/ijbs.23247

Huynh, T. P. V., Davis, A. A., Ulrich, J. D., & Holtzman, D. M. (2017). Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: The influence of apolipoprotein E on amyloid-β and other amyloidogenic proteins. *Journal of Lipid Research*, *58*(5), 824–836. https://doi.org/10.1194/jlr.R075481

Innis, M., Gelfand, D., White, T., Moser, E. I., Krobert, K. A., & Moser, M. (1998). Impaired Spatial Learning after Saturation of Long-Term Potentiation. *Science*, *281*(September), 2038–2043.

Jang, S. S., & Chung, H. J. (2016). Emerging link between Alzheimer's disease and homeostatic synaptic plasticity. *Neural Plasticity*, *2016*, 1–19. https://doi.org/10.1155/2016/7969272

Javier Patino, L. O., Angelica Prieto, R. J., & Enrique Cuc, S. L. (2012). Zanthoxylum Genus as Potential Source of Bioactive Compounds. *Bioactive Compounds in Phytomedicine*, *10*. https://doi.org/10.5772/26037

Jeugd, A. Van Der, Parra-dam, A., Baeta-corral, R., Soto-faguás, C. M., Ahmed, T., Laferla, F. M., … Saura, C. A. (2018). Reversal of memory and neuropsychiatric symptoms and reduced tau pathology by selenium in 3xTg-AD mice. *Scientific Reports*, (January), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41598-018-24741-0

Jiang, Q., Lee, C. Y. D., Mandrekar, S., Wilkinson, B., Cramer, P., Zelcer, N., … Landreth, G. E. (2008). ApoE Promotes the Proteolytic Degradation of Aβ. *Neuron*, *58*(5), 681–693. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.04.010

Johnson, G. V. W., & Stoothoff, W. H. (2004). Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *Journal of Cell Science*, *117*, 5721–5729. https://doi.org/10.1242/jcs.01558

Jung Yu, Hyun- & Koh, S.-H. (2017). The role of PI3K/AKT pathway and its therapeutic possibility in Alzheimer's disease. *Hanyang Med Rev*, *37*(1), 18–24.

Kametani, F., & Hasegawa, M. (2018). Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer ' s Disease. *Front Neurosci.*, *12*(25), 1–11. https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00025

Kang, J., & Rivest, S. (2012). Lipid metabolism and neuroinflammation in alzheimer's disease: A role for liver X receptors. *Endocrine Reviews*, *33*(5), 715–746. https://doi.org/10.1210/er.2011-1049

Kennedy, D. O., & Scholey, A. B. (2006). The Psychopharmacology of European Herbs with Cognition-Enhancing Properties. *Curr Pharm Des.*, *12*(35), 4613–4623.

Khoury, R., Rajamanickam, J., Grossberg, G. T. (2018). An update on the safety of current therapies for Alzheimer's disease: focus on rivastigmine. *Ther. Adv. Drug Saf.*, *9*(3), 171–178. Retrieved from https://doi.org/10.1177/2042098617750555.

Kim, J., Basak, J. M., & Holtzman, D. M. (2009). The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease. *Neuron*, *63*(3), 287–303. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.06.026

Kinney, J. W., Bemiller, S. M., Murtishaw, A. S., Leisgang, A. M., Salazar, A. M., & Lamb, B. T. (2018). Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions*, *4*, 575–590. https://doi.org/10.1016/j.trci.2018.06.014

Kirchgessner, T. G., Sleph, P., Ostrowski, J., Lupisella, J., Ryan, C. S., Liu, X., … Frost, R. J. A. (2016). Beneficial and Adverse Effects of an LXR Agonist on Human Lipid and Lipoprotein Metabolism and Circulating Neutrophils. *Cell Metabolism*, *24*(2),

223–233. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.07.016

Kitagishi, Y., Nakanishi, A., Ogura, Y., & Matsuda, S. (2014). Dietary regulation of PI3K / AKT / GSK-3 β pathway in Alzheimer ' s disease. *Alzheimer's Research and Therapy*, *6*(35), 1–7.

Kong, V., Devenyi, G. A., Gallino, D., Ayranci, G., Germann, J., Rollins, C., & Chakravarty, M. M. (2018). Early-in-life neuroanatomical and behavioural trajectories in a triple transgenic model of Alzheimer ' s disease. *Brain Structure and Function*, *223*(7), 3365–3382. https://doi.org/10.1007/s00429-018-1691-4

Korach-André, M., & Gustafsson, J. Å. (2015). Liver X receptors as regulators of metabolism. *Biomolecular Concepts*, *6*(3), 177–190. https://doi.org/10.1515/bmc-2015-0007

Lee, J., Xu, J., Lee, J., Ku, G., Han, X., Yang, D., … Hsu, C. Y. (2004). Amyloid peptide induces oligodendrocyte death by activating the neutral sphingomyelinase ceramide pathway. *J Cell Biol.*, *5*(164(1)), 123–131. https://doi.org/10.1083/jcb.200307017

Lee, S., Viqar, F., Zimmerman, M. E., Narkhede, A., Tosto, G., Benzinger, T. L. S., … Cairns, N. J. (2017). White matter hyperintensities are a core feature of AD. Evidence from the Dominantly Inherited Alzheimer´s Network. *Ann Neurol.*, *79*(6), 929–939. https://doi.org/10.1002/ana.24647.White

Lezak, K. R., Missig, G., & Carlezon, W. A. (2017). Behavioral methods to study anxiety in rodents. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *19*(2), 181–191. https://doi.org/10.31887/dcns.2017.19.2/wcarlezon

Li, S., Jin, M., Koeglsperger, T., Shepardson, N., Shankar, G., & Selkoe, D. (2011). *Soluble Aβ oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors*. *31*(18), 6627–6638. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0203-11.2011.Soluble

Liang, Y., Lin, S., Beyer, T. P., Zhang, Y., Wu, X., Bales, K. R., … Paul, S. M. (2004). A liver X receptor and retinoid X receptor heterodimer mediates apolipoprotein E expression, secretion and cholesterol homeostasis in astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, *88*(3), 623–634. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02183.x

Liu, D., Pan, X., Zhang, J., Shen, H., Collins, N. C., Cole, A. M., … Chen, X. (2015). APOE4 enhances age-dependent decline in cognitive function by down-regulating an NMDA receptor pathway in EFAD-Tg mice. *Molecular Neurodegeneration*, *10*(7), 1–17. https://doi.org/10.1186/s13024-015-0002-2

Liu, S. L., Wang, C., Jiang, T., Tan, L., Xing, A., & Yu, J. T. (2016). The Role of Cdk5 in Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, *53*(7), 4328–4342. https://doi.org/10.1007/s12035-015-9369-x

Loren, J., Huang, Z., Laffitte, B. A., & Molteni, V. (2013). Liver X receptor modulators: a review of recently patented compounds (2009 – 2012). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, *23*(10), 1317–1335. https://doi.org/10.1517/13543776.2013.814640

Macías, V., Cuca, L. E., & Jiménez, K. (2007). Usos en medicina folclórica, actividad

biológica y fitoquímica de metabolitos secundarios de algunas especies del género Zanthoxylum. *Duazary*, *4*(2), 141–159.

Massoud, F., & Gauthier, S. (2010). Update on the Pharmacological Treatment of Alzheimers Disease. *Current Neuropharmacology*, *8*(1), 69–80. https://doi.org/10.2174/157015910790909520

Mcvoy, J. R. S., Oughli, H. A., & Oh, U. (2015). Liver X receptor-dependent inhibition of microglial nitric oxide synthase 2. *J Neuroinflammation*, *12*, 1–14. https://doi.org/10.1186/s12974-015-0247-2

Ming, G., & Song, H. (2011). Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron*, *70*(4), 687–702. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.001

Ministerio de Salud y Protección Social. (2017). Boletín de salud mental - Demencia. In *Ministerio de Salud*. Retrieved from https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ENT/boletin-depresion-marzo-2017.pdf

Moreno-jiménez, E. P., Flor-garcía, M., Terreros-roncal, J., Rábano, A., Cafini, F., Pallas-bazarra, N., … Llorens-martín, M. (2019). Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer ' s disease. *Nature Medicine*, *25*(April). https://doi.org/10.1038/s41591-019-0375-9

Moura, D. J., Franc, M., Pe, A., Boeira, M., & Saffi, J. (2007). Antioxidant properties of b -carboline alkaloids are related to their antimutagenic and antigenotoxic activities. *Mutagenesis*, *22*(4), 293–302. https://doi.org/10.1093/mutage/gem016

Müller, U. C., Deller, T., & Korte, M. (2017). Not just amyloid: Physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nature Reviews Neuroscience*, *18*(5), 281–298. https://doi.org/10.1038/nrn.2017.29

Muñoz-Cabrera, J. M., Sandoval-Hernández, A. G., Niño, A., Báez, T., Bustos-Rangel, A., Cardona-Gómez, G. P., … Arboleda, G. (2019). Bexarotene therapy ameliorates behavioral deficits and induces functional and molecular changes in very-old Triple Transgenic Mice model of Alzheimer´s disease. *PLoS ONE*, *14*(10), 1–22. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223578

Nam, K. N., Mounier, A., Fitz, N. F., Wolfe, C., Schug, J., Lefterov, I., & Koldamova, R. (2016). RXR controlled regulatory networks identified in mouse brain counteract deleterious effects of Aβ oligomers. *Scientific Reports*, *6*(March), 1–14. https://doi.org/10.1038/srep24048

Nasrabady, S. E., Rizvi, B., Goldman, J. E., & Brickman, A. M. (2018). White matter changes in Alzheimer ' s disease : a focus on myelin and oligodendrocytes. *Acta Neuropathologica*, *6*(22), 1–10.

Ng, Y. P., Or, T. C. T., & Ip, N. Y. (2015). Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, *89*, 260–270.

https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.07.018

Obernier, K., & Alvarez-buylla, A. (2019). Neural stem cells : origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain. *Development*, *146*(4), 1–15. https://doi.org/10.1242/dev.156059

Oddo, S. (2012). The role of mTOR signaling in Alzheimer disease. *Front Biosci*, *4*, 941–952.

Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kayed, R., … LaFerla, F. M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's Disease with plaques and tangles: Intracellular Aβ and synaptic dysfunction. *Neuron*, *39*(3), 409–421. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00434-3

Overk, Cassia R; Masliah, E. (2015). Pathogenesis of synaptic degeneration in Alzheimer´s disease and Lewy Body disease. *Biochem Pharmacol.*, *88*(4), 508–516. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.01.015.PATHOGENESIS

Patiño, O. (2004). Estudio Fitoquímico Parcial de Zanthoxylum quinduensis (Rutaceae). *Tesis de Grado, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia*, 2–56.

Patiño, O., Angelica, P., Lozano, J. M., Lesmes, L., & Cuca, L. E. (2011). Propiedades antibacterianas in vitro de metabolitos secundarios aislados de dos especies del género Zanthoxylum (Rutaceae) Antibacterial properties in vitro of secondary metabolites isolated from two species of Zanthoxylum (Rutaceae) genus. *Rev Cubana Farm*, *45*(3), 431–438.

Pérez, M. J., Jara, C., Quintanilla, R. A., & Frye, R. E. (2018). Contribution of Tau Pathology to Mitochondrial Impairment in Neurodegeneration. *Front Neurosci.*, *12*(July), 1–14. https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00441

Plazas, Erika, R, R. C., Avila, M., Batista, F., Costa, D., & Luis, C. (2019). Metabolomic profiling of Zanthoxylum species : Identification of anti- cholinesterase alkaloids candidates. *Phytochem.*, *168*(September), 112–128. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112128

Plazas, Erika; Casoti, Rosana; Ávila, Mónica; Batista-DaCosta, Fernando; Cuca, L. E. (2019). Metabolomic profiling of Zanthoxylum species: Identification of anti-cholinesterase alkaloids candidates. *Phytochem.*, *168*, 112–128.

Pozueta, J., Lefort, R., & Shelanski, M. L. (2013). *Synaptic changes in Azheimer ' s disease and its models*. *251*, 51–65. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.05.050

Price, D. L., Borchelt, D. R., & Wong, P. C. (2005). *From Neuroscience To Neurology* (Elsevier, Ed.). https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012738903-5/50028-X

Querfurth, LaFerla, F. M. (2010). Mechanisms of Disease: Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*, *362*(4), 329–344.

Quintela-lópez, T., Ortiz-sanz, C., Serrano-regal, M. P., Gaminde-blasco, A., Valero, J., Baleriola, J., … Alberdi, E. (2019). Aβ oligomers promote oligodendrocyte

differentiation and maturation via integrin β1 and Fyn kinase signaling. *Cell Death Dis*, *10*(445), 1–16. https://doi.org/10.1038/s41419-019-1636-8

R. G. M. Morris, P. Garrud, J. N. P. R. & J. O. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, *297*, 681–683.

Rauk, A. (2008). Why is the amyloid beta peptide of Alzheimer ' s disease neurotoxic ? *Dalton Trans.*, *14*(10), 1273–1282. https://doi.org/10.1039/b718601k

Rentz, D. M., Mormino, E. C., Papp, K. V, Betensky, R. A., Sperling, R. A., & Johnson, K. A. (2017). Cognitive resilience in clinical and preclinical Alzheimer ' s disease : the Association of Amyloid and Tau Burden on cognitive performance. *Brain Imaging Behav.*, *11*(2), 383–390. https://doi.org/10.1007/s11682-016-9640-4

Rowe, R., Sheskey, P., & Owen, S. (2006). *Handbook of Pharmaceutical excipients* (5th ed.; P. Press, Ed.).

Saijo, K., Crotti, A., & Glass, C. K. (2013). Regulation of Microglia Activation and Deactivation by Nuclear Receptors. *Glia*, *111*(September 2012), 104–111. https://doi.org/10.1002/glia.22423

Sandoval-Hernández, Adrián G; Hernandez, H.G; Restrepo, A; Muñoz, J.I; Bayon, GF; Fernandez, AF; Fraga, M.F; Cardona-Gomez, G.P; Arboleda, H. A. G. H. (2016). Liver X Receptor Agonist Modifies the DNA Methylation Profile of Synapse and Neurogenesis-Related Genes in the Triple Transgenic Mouse Model of Alzheimer ' s Disease. *J Mol Neurosci.*, *58*(2), 243–253. https://doi.org/10.1007/s12031-015-0665-8

Sandoval-Hernández, A. G., Buitrago, L., Moreno, H., Cardona-Gómez, G. P., & Arboleda, G. (2015). Role of Liver X receptor in AD pathophysiology. *PLoS ONE*, *10*(12), 1–24. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145467

Sandoval-Hernández, A. G. et al. (2016). Nuclear receptors in neural stem cells and oligodendrogenesis. In *Glial cells in health and disease of the CNS* (pp. 292–302).

Santos-Gil, D. F., Arboleda, G., & Sandoval-hernandez, A. G. (2021). Retinoid X receptor activation promotes re-myelination in a very old triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, *750*(September 2020). https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135764

Selkoe, D. J. (2018). *Alzheimer ' s Disease : Genes , Proteins , and Therapy*. *81*(2), 741–766.

Sever, R., & Glass, C. K. (2013). Signaling by nuclear receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(3), 1–4. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016709

Shackleford, G. G., Grenier, J., Habib, W. A., Massaad, C., & Meffre, D. (2017). Liver X Receptors differentially modulate central myelin gene mRNA levels in a region- , age- and isoform-specific manner. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, *169*, 61–68. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.02.032

Shahpasand, K., Uemura, I., Saito, T., Asano, T., Hata, K., Shibata, K., … Hisanaga, S. (2012). Regulation of Mitochondrial Transport and Inter-Microtubule Spacing by Tau Phosphorylation at the Sites Hyperphosphorylated in Alzheimer ' s Disease. *J Neurosci.*, *32*(7), 2430–2441. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5927-11.2012

Silva, L. L., & Paoli, A. A. S. (2000). Caracterização morfo-anatômica da semente de Zanthoxylum rhoifolium Lam. – Rutaceae. *Revista Brasileira de Sementes*, *22*(2), 250–256. https://doi.org/10.17801/0101-3122/rbs.v22n2p250-256

Simons, K., Ehehalt, R., Simons, K., & Ehehalt, R. (2002). *Cholesterol , lipid rafts , and disease Find the latest version : Cholesterol , lipid rafts , and disease*. *110*(5), 597–603. https://doi.org/10.1172/JCI200216390.Lipid

Sodhi, R. K., & Singh, N. (2013). Liver X receptors: Emerging therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Pharmacological Research*, *72*, 45–51. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.03.008

Stelzmann, R. A., Norman Schnitzlein, H., & Reed Murtagh, F. (1995). An english translation of alzheimer's 1907 paper, "Uber eine eigenartige erkankung der hirnrinde." *Clinical Anatomy*, *8*(6), 429–431. https://doi.org/10.1002/ca.980080612

Stricker, N. H., Schweinsburg, B. C., Delano-wood, L., Wierenga, C. E., Bangen, K. J., & Haaland, K. Y. (2009). Decreased white matter integrity in late-myelinating fi ber pathways in Alzheimer ' s disease supports retrogenesis. *NeuroImage*, *45*(1), 10–16. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.11.027

Suzuki, K. et al. Physiological Role of Amyloid Beta in Neural Cells: The Cellular Trophic Activity. , 2 Intech open 64 (2014).

Terwel, D., Steffensen, K. R., Verghese, P. B., Kummer, M. P., Gustafsson, J.-åke, Holtzman, D. M., & Heneka, M. T. (2011). Critical Role of Astroglial Apolipoprotein E and Liver X Receptor Expression for Microglial AB Phagocytosis. *J Neurosci*, *31*(January 2014). https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6546-10.2011

Thomas, D. ., Doran, A. ., Fotakis, P., Westerterp, M., Antonson, P., Jiang, X. ., … Tall, A. . (2018). LXR Suppresses Inflammatory Gene Expression and Neutrophil Migration through cis-Repression and Cholesterol Efflux. *Cell Rep*, *25*(13), 3774–3785.

Tosto, G; Zimmerman, M.E; Hamilton, J.L; Carmichel, O.T; Brickman, A. (2016). The effect of white matter hyperintensities on neurodegeneration in mild cognitive impairment. *Alzheimer's & Dementia*, *11*(12), 1510–1519. https://doi.org/10.1016/j.jalz.2015.05.014.The

Turner, P. V, Brabb, T., Pekow, C., & Vasbinder, M. A. (2011). Administration of Substances to Laboratory Animals : Routes of Administration and Factors to Consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, *50*(5), 600–613.

Valencia, E. (2017). *Generación de un modelo in vitro para evaluar la actividad agonista de extractos naturales, obtenidos de plantas de las familias de Lauráceas y Miristicáceas, sobre los receptores X del hígado (LXRs)*. Universidad Nacional De Colombia.

Wang, R., & Reddy, P. H. (2017). Role of glutamate and NMDA receptors in Alzheimer's

disease. *J Alzheimers Dis.*, *57*(4), 1041–1048. https://doi.org/10.3233/JAD-160763.Role

Wang, S., Zhang, Z., Zhu, T., Chu, S., He, W., & Chen, N. (2018). Myelin injury in the central nervous system and Alzheimer ' s disease. *Brain Research Bulletin*, *140*(May), 162–168. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.05.003

Wang, Y., & Sheng, M. (2014). Local Pruning of Dendrites and Spines by Caspase-3-Dependent and Proteasome-Limited Mechanisms. *J Neurosci.*, *34*(5), 1672–1688. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3121-13.2014

Wilde, M. C. De, Overk, C. R., Sijben, J. W., Masliah, E., Nutrition, A. M., Diego, S., … Jolla, L. (2017). Meta-analysis of synaptic pathology in Alzheimer's disease reveals selective molecular vesicular machinery vulnerability. *Alzheimers Dement.*, *12*(6), 633–644. https://doi.org/10.1016/j.jalz.2015.12.005.Meta-analysis

Wisniewski, T., & Drummond, E. (2020). APOE-amyloid interaction: Therapeutic targets. *Neurobiology of Disease*, *138*(December 2019). https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104784

Wolfer, D. P., & Lipp, H. (2014). Dissecting the behaviour of transgenic mice : is it the mutation , the genetic background , or the environment? *Exp Physiol*, *85*(6), 627–634.

Wood, H. (2020). Retinoid X receptor mediates brain clean-up after stroke. *Nat Rev Neur*, *16*, 128–129.

Wu, C., Chen, C., Chai-You, L., Tai-Ho, H., Chao-Chang, L., Chao, M., & Chen, S. (2007). Treatment with TO901317, a synthetic liver X receptor agonist, reduces brain damage and attenuates neuroinflammation in experimental intracerebral hemorrhage. *J Neuroimmunol*, *183*(1), 50–59.

Xu, F., Na, L., Li, Y., & Chen, L. (2020). Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours. *Cell & Bioscience*, *10*(54). Retrieved from https://doi.org/10.1186/s13578-020-00416-0

Yang, S., Liu, Y., Wang, J., Wang, Y., Pan, W., & Sheng, W. (2014). Isoquinoline alkaloids from Zanthoxylum simulans and their biological evaluation. *J Antibiot (Tokyo)*, *68*(4), 289–292. https://doi.org/10.1038/ja.2014.139

Yuste, R. (2015). The discovery of dendritic spines by Cajal. *Front Neuroanat.*, *9*(18), 1–6. https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00018

Zelcer, N., Khanlou, N., Clare, R., Jiang, Q., Reed-Geaghan, E. G., Landreth, G. E., … Tontonoz, P. (2007). Attenuation of neuroinflammation and Alzheimer's disease pathology by liver x receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(25), 10601–10606. https://doi.org/10.1073/pnas.0701096104

Zhang-Gandhi, C., & Drew, P. D. (2007). Liver X Receptor and Retinoid X Receptor Agonists Inhibit Inflammatory Responses of Microglia and Astrocytes. *J*

Neuroimmunol, *183*(1–2), 50–59.

Zhao, C., Teng, E. M., Jr, R. G. S., Ming, G., & Gage, F. H. (2006). Distinct Morphological Stages of Dentate Granule Neuron Maturation in the Adult Mouse Hippocampus. *J Neurosci.*, *26*(1), 3–11. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3648-05.2006

Zhao, N., Liu, C. C., Qiao, W., & Bu, G. (2018). Apolipoprotein E, Receptors, and Modulation of Alzheimer's Disease. *Biological Psychiatry*, *83*(4), 347–357. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.03.003

Zhong, N., & Weisgraber, K. H. (2009). Understanding the association of apolipoprotein E4 with Alzheimer disease: Clues from its structure. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(10), 6027–6031. https://doi.org/10.1074/jbc.R800009200

Zhou, B., Xia, Y., Ruo, Z., & Jiang, T. (2019). Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. *CNS Neurosci Ther.*, *25*(February), 665–673. https://doi.org/10.1111/cns.13123