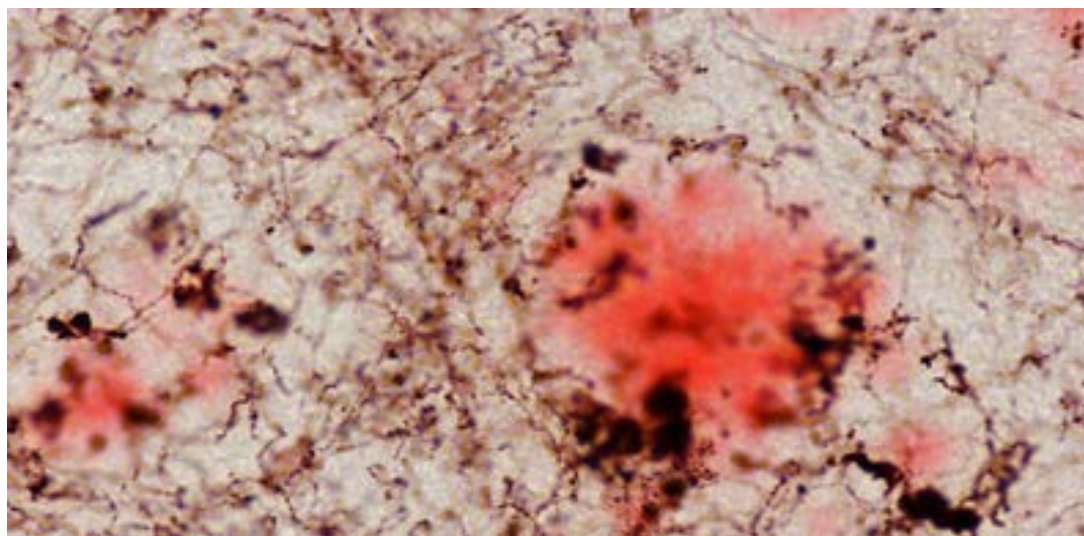


Málaga
2015

TESIS DOCTORAL

Caracterización neuropatológica y evaluación preclínica de potenciales estrategias terapéuticas en modelos animales transgénicos de la enfermedad de Alzheimer



Laura Isabel Trujillo Estrada

*Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología
Área de Biología Celular*



AUTOR: Laura Isabel Trujillo Estrada

 <http://orcid.org/0000-0001-6696-4505>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología

Área de Biología Celular

Facultad de Ciencias

Universidad de Málaga

TESIS DOCTORAL

Caracterización neuropatológica y evaluación preclínica de potenciales estrategias terapéuticas en modelos animales transgénicos de la enfermedad de Alzheimer

Memoria presentada por la Licenciada
Dña. Laura Isabel Trujillo Estrada para
Optar al Grado de Doctor por la
Universidad de Málaga

Directores: Dra. Antonia Gutiérrez Pérez y Dr. David Baglietto-Vargas

Málaga, 2015

Dra. Dña. Antonia Gutiérrez Pérez, Catedrática del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga,

Dr. D. David Baglietto Vargas, Assistant Project Scientist at Department of Neurobiology and Behavior, University of California (EEUU),

INFORMAN

Que Dña. Laura Isabel Trujillo Estrada ha realizado bajo su dirección el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral, titulada “**Caracterización neuropatológica y evaluación preclínica de potenciales estrategias terapéuticas en modelos animales transgénicos de la enfermedad de Alzheimer**”. Considerando que constituye trabajo de Tesis Doctoral, autorizamos su presentación para optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firman el presente documento en Málaga, a 29 de Junio de 2015.



Fdo.: Antonia Gutiérrez Pérez



Fdo.: David Baglietto Vargas



Prof. Dr. D. José Becerra Ratia, Catedrático de Biología Celular y Director del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga,

INFORMA

Que Dña. Laura Isabel Trujillo Estrada ha realizado el trabajo experimental, que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral bajo la dirección de la Dra. Antonia Gutiérrez y el Dr. David Baglietto-Vargas, en los laboratorios del Área de Biología Celular del Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente documento en Málaga, a 29 de Junio de 2015.

Fdo.: D. José Becerra Ratia

El presente trabajo de Tesis Doctoral se ha financiado por los siguientes **proyectos de investigación**:

Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED).

Programa 1: Enfermedad de Alzheimer y otras demencias degenerativas. Entidad financiera: Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Ciencia e Innovación, Ref. grupo CB06/05/1116. IP: Dra. Antonia Gutiérrez. Duración: 2007-2015 (renovable).

Mecanismos de señalización de la respuesta inflamatoria en la enfermedad de Alzheimer: control de la activación microglial como estrategia terapéutica neuroprotectora. Entidad financiera:

Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación, Ref. PI09/099. IP: Dra. Antonia Gutiérrez Pérez. Duración: 2010-2012.

Oligómeros tóxicos del Abeta como agentes causantes de la disfunción del citoesqueleto y los procesos proteolíticos en la enfermedad de Alzheimer: búsqueda de nuevas dianas terapéuticas. Entidad financiera: Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Economía y Competitividad, Ref. PI12/01431. IP: Dra. Antonia Gutiérrez Pérez. Duración: 2013-2015.

Activación glial en el proceso neuroinflamatorio: una potencial diana terapéutica para la enfermedad de Alzheimer. Subproyecto 02 del Proyecto Colaborativo Intramural. Entidad financiera: *Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). Proyecto Intramural Colaborativo.* Ref. PI2010/08. IP Subproyecto 02: Dra. Antonia Gutiérrez Pérez. Duración: 2010-2013.

Propiedades emergentes de la relación neurona-glia que subyacen a neurodegeneración y demencia en la enfermedad de Alzheimer. Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). Proyecto Intramural Colaborativo. Entidad financiera: Ref. 2013/01. IP Subproyecto 05: Dra. Antonia Gutiérrez Pérez. Duración: 2013-2015.

Evaluación in vivo de un compuesto de interés. Desarrollo preclínico y estudio previo de entrada a fases clínicas de un nuevo fármaco (Proyecto OTRI). Entidad financiera: Neuron Biopharma, Ref. Contrato OTRI 8.06/5.02.3621. IP: Dra. Antonia Gutiérrez Pérez. Duración: 2010-2013.

Dña. Laura Isabel Trujillo Estrada, durante este tiempo ha disfrutado de una beca predoctoral adscrita a créditos de investigación (Proyecto SAS PI0496/09), una beca de Formación del Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación (convocatoria 2009), y un contrato de Investigación con cargo a Proyecto de Investigación.

Durante la realización de la presente Tesis Doctoral, se han publicado los siguientes artículos científicos en revistas internacionales:

1. **Trujillo-Estrada L, Dávila JC, Sánchez-Mejias E, Sánchez-Varo R, Gomez-Arboledas A, Vizuite M, Vitorica J, Gutiérrez A.** (2014). Early neuronal loss and axonal/presynaptic damage is associated with accelerated amyloid- β accumulation in A β PP/PS1 Alzheimer's disease mice subiculum. *J Alzheimers Dis.*, 42(2):521-541.
2. **Trujillo-Estrada L, Jimenez S, De Castro V, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Navarro V, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Davila JC, Vizuite M, Gutierrez A, Vitorica J.** (2013). In vivo modification of Abeta plaque toxicity as a novel neuroprotective lithium-mediated therapy for Alzheimer's disease pathology. *Acta Neuropathol Commun.*, 12;1(1):73.
3. **Sanchez-Varo R, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, De Castro V, Jimenez S, Ruano D, Vizuite M, Davila JC, Garcia-Verdugo JM, Jimenez AJ, Vitorica J, Gutierrez A.** (2012). Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer's mice hippocampus. *Acta Neuropathol.*, 123(1):53-70.
4. **Torres M, Jimenez S, Sanchez-Varo R, Navarro V, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Carmona I, Davila JC, Vizuite M, Gutierrez A, Vitorica J.** (2012). Defective lysosomal proteolysis and axonal transport are early pathogenic events that worsen with age leading to increased APP metabolism and synaptic Abeta in transgenic APP/PS1 hippocampus. *Mol Neurodegener.*, 7:59.
5. **Jimenez S, Torres M, Vizuite M, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Trujillo-Estrada L, Carmona-Cuenca I, Caballero C, Ruano D, Gutierrez A, Vitorica J.** (2011). Age-dependent accumulation of soluble amyloid beta (Abeta) oligomers reverses the neuroprotective effect of soluble amyloid precursor protein-alpha (sAPP(alpha)) by modulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-GSK-3beta pathway in Alzheimer mouse model. *J Biol Chem.*, 286(21):18414-18425.
6. **Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuite M, Vitorica J, Gutierrez A.** (2010). Calretinin interneurons are early targets of extracellular amyloid-beta pathology in PS1/AbetaPP Alzheimer mice hippocampus. *J Alzheimers Dis.*, 21(1):119-132.
7. **Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Del Rio JC, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuite M, Vitorica J, Gutierrez A.** (2009). Extracellular amyloid-beta and cytotoxic glial activation induce significant entorhinal neuron loss in Young PS1(M146L)/APP(751SL) mice. *J Alzheimers Dis.*, 18(4):755-776.

Como dijo William Arthur Ward, “si se siente gratitud y no se la expresa es como envolver un regalo y no darlo”. Pues allá vamos...

Sin lugar a dudas, esta Tesis no es únicamente fruto de mi trabajo. Aquí han colaborado de maneras muy diversas muchas personas, que me han ayudado a llevar a cabo este trabajo, ya fuera de manera consciente o no. Es a ellas a quienes va dirigido este pequeño apartado de la Tesis.

En primer lugar a mi directora, la Dra. Antonia Gutiérrez. Antonia, ni en un millón de páginas podría describir y agradecer todo lo que me has aportado. Por depositar en mi tanta confianza desde un principio (hace mucho mucho tiempo, aunque parezca que fue ayer... más de 10 años!) y, sobre todo, por seguir haciéndolo. Me has dado la oportunidad de formar parte de un gran grupo, de una gran familia y sobre todo has sido un ejemplo de constancia, dedicación, buen hacer, lucha ante las dificultades (que las ha habido) y amor por este trabajo. Gracias de corazón.

Gracias infinitas también a mi codirector, el Dr. David Baglietto. David, eres un gran ejemplo de constancia y dedicación, un ejemplo de que con perseverancia se puede alcanzar cualquier meta. Gracias por enseñarme tanto en el laboratorio, por los momentos compartidos y por cuidarme tanto.

A José Carlos por su desinteresada colaboración en la revisión del manuscrito de esta Tesis, por aportar siempre ideas para mejorar. Por su guía en los experimentos de microscopía electrónica. En general, gracias por mimarnos tanto, por todos tus detalles con el grupo y por tu disposición a ayudar siempre, sobre todo por hacerlo intentando sacar una sonrisa. Porque aunque sea el “mayor”, es el espíritu joven del grupo.

Por supuesto, tengo que agradecer profundamente la ayuda y la amistad a las personas con las que más tiempo he compartido durante la realización de esta Tesis: mis compañeros de grupo. A los que ya no están y a los que siguen aquí al pie del cañón. A Juan Félix e Inés por haberme enseñado tanto y con tanto cariño. A Raquel y Eli por ser mis grandes compañeras en los buenos y malos ratos, por tanto compartido durante este tiempo. A Ángela y Mercedes, por sus charlas y consejos. A Vanessa, Cristina, Juanjo y Rubén por su ánimos, gran ayuda y disposición a colaborar. Sois una gran familia, venga lo que venga en un futuro no cambiéis. De todos vosotros he aprendido algo y espero haberos enseñado algo también. Gracias por los momentos vividos, dentro y fuera del laboratorio, que han sido muchos.

Este último agradecimiento se hace extensible a otro gran grupo con el que he tenido la suerte de compartir laboratorio. A Alejandra y Jose por su infinita amistad y tantos buenos momentos. También a Diana y Kirill por su compañía y los buenos ratos. Muchas gracias también a la gente que de alguna manera ha estado vinculada con nuestro laboratorio. A Pedro, Julia, Luis, Carolina, Irene y Mariam, porque habéis formado parte de nuestro día a día y habéis contribuido, con vuestras charlas y consejos, a que todo sea más llevadero. Pero sobre todo, gracias por los momentos compartidos, habéis sido una parte importante para mí tanto a nivel personal como laboral.

Muchas gracias al Dr. Javier Vitorica por su inestimable ayuda y colaboración en la elaboración de esta Tesis. Muchas gracias también a todos los miembros de su equipo: Marisa, Sebastián, Vicky, etc. Sin ellos, este trabajo no hubiese sido lo mismo.

Al director del departamento de Biología Celular, el Dr. José Becerra, por permitirme realizar mi trabajo en las instalaciones del departamento, y a todos los compañeros del Departamento, especialmente a Ana y Ángel por su disposición a ayudar siempre que lo he necesitado, sois encantadores.

A todos los profesionales de los servicios centrales de apoyo a la investigación que han contribuido a esta Tesis. A David, por su grandísima ayuda con el microscopio confocal, por sacarme de más de un apuro con éste, por su eterna disposición a ayudar. A Manoli por su ayuda con las técnicas de análisis de imagen y su implicación. A Adolfo, por su soporte con la microscopía electrónica. Al personal del estabulario de la Universidad de Málaga.

Al Dr. LaFerla, por su acogida durante los tres meses de estancia predoctoral en su laboratorio de la Universidad de California. En especial a Masashi por enseñarme tanto en tan poco tiempo, fue una experiencia increíble.

A mis grandísimos amigos Agustina, Jose y Patri. También a Carlos, Ana y Marco. Por sus ánimos y comprensión, por conocerme y saber que necesito con solo mirarme, por sus valiosos consejos. Por esos Filos, zombies y barbacoas. Simplemente, gracias por haber estado a mi lado todos estos años (y los que quedan por venir).

Para terminar, no puedo acabar este capítulo de agradecimientos sin acordarme de mis padres y hermanas, Mónica y Patricia. A ellos les debo todo lo que soy, gracias por su dedicación y por haberme permitido elegir mi camino mostrándome siempre su apoyo. Por confiar en mis decisiones. Por haberme enseñado que con esfuerzo, trabajo y constancia, todo se consigue. Como dijo Álvaro Mutis, “cuando la gratitud es tan absoluta las palabras sobran”.

Finalmente, quiero darle las gracias a Juanje por comprender mi trabajo, por su apoyo y por los ánimos incondicionales para seguir adelante. Por los fines de semana en casa y haber llevado todo el peso del hogar en estos últimos meses. Por la ilusión que le pones a todo. Gracias por darme durante este período, y siempre, todo lo que he necesitado, incluso cuando no lo he pedido con palabras.

Espero no haberme dejado a nadie atrás. Por si acaso, gracias a todos los que estáis leyendo esta Tesis.

*A todos, **Gracias.***

A mi familia

A Juanje

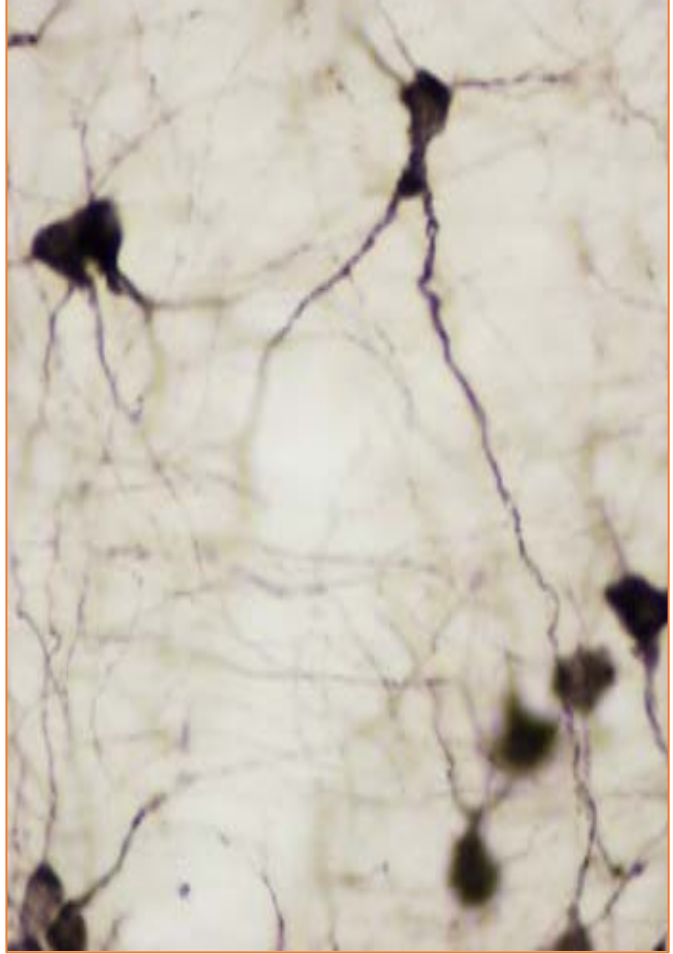
*La ciencia será siempre una búsqueda,
jamás un descubrimiento real.
Es un viaje, nunca una llegada.*

Karl Popper



α7nAChR: subunidad alfa 7 del receptor nicotínico de acetilcolina	FPP: Farnesil pirofosfato
a: <i>alveus</i>	g: capa granular del giro dentado
Aβ, Abeta: β-amiloide	GABA: Ácido gamma amino butírico
Aβi: β-amiloide intracelular	GAD: Glutamato descarboxilasa
ACh: acetilcolina	GAPDH: del inglés <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
AChE: acetilcolinesterasa	GD: giro dentado
AChEIs: inhibidores de la acetilcolinesterasa	GDNF: del inglés <i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
AD: <i>Alzheimer's Disease</i>	GFAP: Proteína glial fibrilar ácida (del inglés <i>glial fibrillary acidic protein</i>)
ADAM: del inglés <i>A disintegrin and metalloprotease</i>	GGPP: Geranil geranilpirofosfato
ADEVA: análisis de la varianza	GSK-3: Quinasa glucógeno sintasa 3
AICD: dominio intracelular del APP	h: hilio del giro dentado
AINE: antiinflamatorios no esteroideos	hBDB: núcleo horizontal de la banda diagonal de Broca
ANOVA: análisis de la varianza (del inglés <i>ANalysis Of VAriance</i>)	HE: heterocigoto
APOE: Apolipoproteína E	HIPP: interneuronas del hilo asociadas a la vía perforante (del inglés <i>hilar interneurons of performant pathway</i>)
APP: Proteína precursora β-amiloide	HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
βAPP: fracción APP beta soluble	HO: homocigoto
BACE: enzima de corte del APP en el sitio beta	HSP: Proteína del choque térmico (del inglés <i>Heat shock protein</i>)
BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro.	Iba1: del inglés <i>ionized calcium binding adapter molecule 1</i>
BF: telencéfalo basal (del inglés <i>basal forebrain</i>)	IDE: Enzima degradadora de insulina
CA: Cuerno de Ammon	IFN-γ: Interferón gamma
CatD: Catepsina D	Ig: Inmunoglobulina
CCK: Colecistoquinina	IGF-1: Factor de crecimiento insulínico de tipo 1 (del inglés <i>insulin-like growth factor-1</i>)
CD: del inglés <i>cluster of differentiation</i>	IL: Interleuquina
CE: Corteza entorrinal	IN: interneurona
ChAT: colinacetiltransferasa (del inglés <i>choline acetyltransferase</i>)	iNOS: Sintasa del óxido nítrico inducible
COX: Ciclooxygenasa	KI: <i>knock-in</i>
CR: Calretinina	KO: <i>knockout</i>
CTF: fragmento C-terminal	LAMP2: del inglés <i>Lysosome-associated membrane protein 2</i>
DAB: 3-3'-diaminobencidina tetrahydroclorhídrico	LC3: del inglés <i>Light chain 3</i>
DABCO: 1,4-diazabicyclo[2.2.2]-octano	Li: Litio, <i>Lithium</i>
DEPC: Dietilpirocarbonato	Lond; L: Mutación <i>London</i> de APP
DN: densidad numérica	LRP1: del inglés <i>Low density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
EA: enfermedad de Alzheimer	LTD: depresión a largo plazo
EC, Ent: <i>entorhinal cortex</i>	LTP: potenciación a largo plazo
ELISA: del inglés <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>	m: capa molecular del giro dentado
EM: Electron microscopy	
eNOS: Sintasa del óxido nítrico endotelial	
ERK: del inglés <i>extracellular-signal-regulated kinases</i>	
FAD: Alzheimer familiar (del inglés, <i>Familial Alzheimer's Disease</i>)	

M1: estadio clásico de activación de los macrófagos	RSG: corteza retrosplenial granular
M2: estadio alternativo de activación de los macrófagos	RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
MAP: Proteína de unión a microtúbulos	S, SUB: Subículo
MCI: del inglés <i>Mild cognitive impairment</i>	SAP: Saporina
me: capa molecular externa del giro dentado	sAPPα: Fracción APP alfa soluble
MET: microscopía electrónica de transmisión	sAPPβ: Fracción APP beta soluble
MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad	SD: <i>Standard deviation</i>
mi: capa molecular interna del giro dentado	SDS: Dodecilsulfato sódico
MMP: Metaloproteasas de matriz	SL: Mutaciones <i>Swedish</i> y <i>London</i> de APP
MT: Microtúbulos	slm: <i>stratum lacunosum-moleculare</i>
NBM: Núcleo basal de Meynert	SLu: <i>stratum lucidum</i>
ND: <i>numnerical density</i>	SM: <i>Septum</i> medial
NeuN: núcleos neuronales	SNC: Sistema nervioso central
NF: Neurofilamento	so: <i>stratum oriens</i>
NFs: Factores neurotróficos	SOM: Somatostatina
NFTs: Ovillos neurofibrilares (del inglés <i>neurofibrillary tangles</i>)	sp: <i>stratum pyramidale</i>
NGF: Factor de crecimiento nervioso	sr: <i>stratum radiatum</i>
NMDA: Ácido N-metil-D-aspartico	SST: Receptores de somatostatina
NO: óxido nítrico	Swe, S: mutación <i>Swedish</i> de la APP
NPY: Neuropeptido Y	Syn: sinaptofisina
NT: Neurotrofinas	TEMED: del inglés <i>Tetramethylenediamine</i>
O-LM: interneuronas del <i>stratum oriens-lacunosum-moleculare</i>	Tg: transgénico
p75^{NTR}: Receptor de neurotrofinas p75	TG: red Trans Golgi
PB: Tampón fosfato	TGF-β: Factor de crecimiento transformante beta
PBS: Tampón fosfato salino	Th: Linfocito T helper
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa	Tio-S, Thio-S: Tioflavina S
PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas	TLR: del inglés <i>Toll like receptor</i>
Per: <i>Perirhinal cortex</i>	TNF-α: Factor de necrosis tumoral α , del inglés <i>Tumor necrosis factor</i>
PET: Tomografía por emisión de positrones	TPBS: <i>Buffer</i> PBS Tween 20
PHF: filamentos apareados helicoidales	TREM2: del inglés <i>triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i>
PLP: Paraformaldehído, L-lisina, Metaperyodato sódico	TrkA: del inglés <i>tropomyosin-related kinase A</i>
PP: Proteínas fosfatasas	Ub: Ubiquitina
PPARγ: Del inglés <i>peroxisome proliferator-activated receptor-gamma</i>	V1: corteza visual primaria
PrP: proteína priónica	vBDB: núcleo vertical de la banda diagonal de Broca
PS: Presenilina	VChAT: Transportador vesicular de ChAT
PV: Parvalbúmina	VGAT: Transportador vesicular de GABA
RC: rojo congo	VGLUT: transportador vesicular de glutamato
RE: retículo endoplasmático	VIP: Polipéptido intestinal vasoactivo
ROS: especies reactivas de oxígeno	WB: <i>Western blot</i>
	WT: genotipo salvaje (del inglés <i>wild type</i>)



Índices

1.

INTRODUCCIÓN	1
1.1. La enfermedad de Alzheimer	3
1.1.1. Tipos de Alzheimer. Factores de riesgo	4
1.1.2. Neuropatología	6
1.1.3. Biogénesis y degradación del β -amiloide	8
1.1.3.1. APP	8
1.1.3.2. Presenilinas: PS1 y PS2	9
1.1.3.3. Procesamiento de APP	10
1.1.3.4. El péptido β -amiloide ($A\beta$)	12
1.1.3.4.1. Tipos de depósitos extracelulares de β -amiloide	13
1.1.3.4.2. Formas oligoméricas del β -amiloide	14
1.1.3.4.3. Acumulación intracelular de β -amiloide	14
1.1.3.4.4. Degradación del β -amiloide	16
1.1.4. Ovillos neurofibrilares intracelulares y la proteína Tau	16
1.1.5. Pérdida neuronal y sináptica	18
1.1.6. Neuroinflamación	19
1.1.6.1. Microglía	20
1.1.6.2. Astroglía	22
1.1.6.3. Citoquinas y radicales libres	23
1.1.7. Hipótesis de la Enfermedad de Alzheimer	24
1.1.7.1. Hipótesis de la cascada amiloide	24
1.1.7.2. Hipótesis de la neurodegeneración del citoesqueleto neuronal	25
1.1.7.3. Hipótesis colinérgica	25
1.1.7.4. Hipótesis neurovascular	26
1.1.7.5. Hipótesis inflamatoria	26
1.1.7.6. Otras hipótesis de la EA	26
1.2. Modelos transgénicos de Alzheimer	27
1.2.1. Modelos transgénicos monogénicos basados en APP	28
1.2.2. Modelos transgénicos monogénicos basados en PS	29
1.2.3. Modelos transgénicos bigénicos PS1/APP	30
1.2.4. Modelos transgénicos basados en TAU	30
1.2.5. Animales transgénicos inducibles	32
1.3. Estrategias terapéuticas para el Alzheimer	34
1.3.1. Estrategias terapéuticas basadas en $A\beta$	35
1.3.2. Estrategias centradas en Tau	37
1.3.3. Estrategias colinérgicas	39
1.3.4. Terapias antiinflamatorias	39
1.3.5. Terapias antioxidantes y uso de factores neurotróficos	40
1.3.6. Estatinas	41

1.3.7. Terapia con células madre	41
1.3.8. Terapia multimodal	41
1.4. Planteamiento del trabajo y objetivos	42
Bibliografía	44

2.

MATERIAL Y MÉTODOS	61
2.1. Animales de experimentación	63
2.1.1. Animales con dieta suplementada con litio	66
2.1.2. Animales tratados con el compuesto NST0037 (nueva estatina no comercial; Neuron Bio)	66
2.1.3. Animales modificados genéticamente: APP/IL4 ^{-/-}	67
2.1.4. Delimitación anatómica de las regiones de estudio	69
2.1.4.1. <i>La formación hipocampal</i>	69
2.1.4.2. <i>Áreas corticales</i>	72
2.1.4.3. <i>Núcleos del telencéfalo basal</i>	73
2.2. Preparación del tejido para microscopía óptica	75
2.2.1. Fijación	75
2.2.2. Crioprotección y congelación	75
2.2.3. Obtención de secciones en el micrótopo de congelación	76
2.3. Tinciones histológicas	76
2.3.1. Tinción general con violeta de cresilo	76
2.3.2. Tinción de placas amiloides fibrilares con rojo congo	77
2.3.3. Marcaje fluorescente de placas amiloides fibrilares con Tioflavina S	77
2.4. Técnicas inmunohistoquímicas para microscopía óptica a campo claro y fluorescencia	78
2.4.1. Marcaje inmunohistoquímica para microscopía óptica convencional	79
2.4.1.1. <i>Marcaje inmunohistoquímico doble para microscopía convencional con revelado DAB-Níquel/DAB</i>	83
2.4.1.2. <i>Marcaje inmunohistoquímico múltiple (5x) a microscopía de campo claro para diferenciar células principales de interneuronas</i>	83
2.4.2. Marcaje inmunohistoquímico doble/triple para microscopía de fluorescencia	85
2.4.3. Controles de la técnica inmunohistoquímica	87
2.5. Obtención de imágenes microscópicas	87
2.5.1. Imágenes para microscopía convencional de campo claro	87
2.5.2. Imágenes para microscopía de fluorescencia	88
2.5.3. Procesamiento de imágenes	88
2.6. Microscopía electrónica de transmisión (MET)	89
2.6.1. Fijación y conservación	89
2.6.2. Obtención de las secciones	89
2.6.3. Deshidratación e inclusión en plano	89

2.6.4. Montaje y tallado de las secciones en bloques de resina	90
2.6.5. Ultramicrotomía	91
2.6.6. Protocolo general de la técnica inmunohistoquímica para MET	91
2.6.7. Observación y obtención de las imágenes	93
2.7. Cuantificación mediante estereología	93
2.7.1. Fraccionador óptico	94
2.7.2. Densidad numérica	96
2.7.3. Nucleador: tamaño de placas	97
2.8. Cuantificación mediante análisis de imagen	99
2.8.1. Estudio de la carga amiloide: <i>plaque loading</i>	99
2.8.2. Estudio del área ocupada por distrofias	100
2.8.3. Análisis de la compactación de las placas de β -amiloide	101
2.8.4. Estudio del halo oligomérico de las placas de Abeta	102
2.8.5. Estudio de la morfología microglial en los animales APP y APP/IL4 ^{-/-}	102
2.9. Estudios bioquímicos	104
2.9.1. Disección del hipocampo y la corteza	104
2.9.2. Aislamiento de ARN y proteínas a partir de los núcleos del cerebro	104
2.9.2.1. Aislamiento de ARN	105
2.9.2.2. Aislamiento de proteínas totales	106
2.9.3. Retrotranscripción	106
2.9.4. RT-PCR en tiempo real	107
2.9.5. <i>Western-Blot</i> (WB)	111
2.9.6. ELISA (Del inglés <i>Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay</i>)	112
2.10. Estudios de comportamiento	113
2.10.1. Estudios de comportamiento para el tratamiento de litio	114
2.10.1.1. Prueba “ <i>Open field</i> ”	114
2.10.1.2. Prueba de reconocimiento de objetos	114
2.10.2. Estudios de comportamiento en animales PS1/APP y PS1 a los 12 meses de edad	115
2.11. Análisis estadístico de datos	116
2.12. Apéndice	117
2.12.1. Genotipado	117
2.12.2. Tampones para inmunohistoquímica	119
2.12.3. Solución fijadora	119
2.12.4. Solución crioprotectora	120
2.12.5. Portaobjetos gelatinizados	120
2.12.6. Solución de revelado	120
2.12.7. Protocolo de deshidratación y montaje	121
2.12.8. Medio de montaje para inmunohistoquímica fluorescente	121
2.12.9. Preparación de microscopía electrónica de transmisión (MET)	121
2.12.10. Tinciones	122
2.12.11. Gel de agarosa para electroforesis	123

2.12.12. Gel de acrilamida 16%-SDS para electroforesis/gel de empaque 3%	123
2.12.13. Gel de acrilamida-SDS-Urea 8M para electroforesis/gel de empaque 3%/gel de carga (Separación isoformas de A β)	124
2.12.14. Listado de reactivos	125
Bibliografía	127
RESULTADOS	129
3.1. Early neuronal loss and axonal/presynaptic damage is associated with accelerated amyloid-β accumulation in PS1/APP Alzheimer's disease mice subiculum	133
Introduction	133
Results	135
3.1.1. Selective loss of subicular interneurons at early ages	135
3.1.2. Loss of subicular principal neurons at early ages	138
3.1.3. Accelerated intra- and extracellular A β accumulation in the subiculum	138
3.1.4. A β plaques as inductors of early axonal/presynaptic pathology in the subiculum	145
Discussion	148
References	153
3.2. Degeneración de neuronas colinérgicas del telencéfalo basal en modelos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer	157
Introducción	157
Resultados	161
3.2.1. Pérdida de neuronas colinérgicas en el telencéfalo basal de animales transgénicos de la enfermedad de Alzheimer	161
3.2.2. Alteración de los terminales colinérgicos hipocampales	171
3.2.3. Patología neurítica colinérgica temprana en el hipocampo y la corteza cerebral	177
3.2.4. Progresión temporal de la patología amiloide del telencéfalo basal	183
3.2.5. Vulnerabilidad de interneuronas colinérgicas de la corteza cerebral	183
3.2.6. Estudio de los déficits cognitivos en modelos transgénicos de la EA. Correlación con la pérdida de neuronas colinérgicas. Prueba de reconocimiento de objetos	188
Discusión	193
Bibliografía	204
3.3. In vivo modification of Abeta plaque toxicity as a novel neuroprotective lithium-mediated therapy for Alzheimer's disease pathology	215
Introduction	215
Results	217

3.

3.3.1. Lithium treatment rescued behavioral/memory deficits	217
3.3.2. Lithium administration prevented neuronal loss	217
3.3.3. Lithium treatment ameliorated axonal/synaptic pathology by reducing abnormal intracellular protein accumulation	223
3.3.4. Lithium treatment substantially modified the morphology and toxicity of the extracellular Abeta plaques	223
3.3.5. Lithium treatment induced astrocyte activation and the incorporation of Hsps to Abeta plaques	234
Discussion	238
Resultados suplementarios: El tratamiento con litio protege de la degeneración colinérgica en modelos de Alzheimer	236
References	242
3.4. Evaluación preclínica en un modelo transgénico de Alzheimer del potencial terapéutico de una nueva estatina	245
Introducción	245
Resultados	247
3.4.1. Reducción de la carga amiloide por el tratamiento	247
3.4.2. Efecto neuroprotector del tratamiento con NST0037	256
3.4.2.1. <i>El tratamiento con NST0037 redujo la acumulación de neuritas distróficas</i>	256
3.4.2.2. <i>El tratamiento con NST0037 redujo la acumulación de vesículas autofágicas en las neuritas distróficas</i>	258
3.4.2.3. <i>Efecto neuroprotector del tratamiento NST0037 sobre la población de interneuronas SOM-positivas</i>	263
3.4.2.4. <i>El tratamiento con NST0037 no previene la pérdida de neuronas colinérgicas, aunque sí la formación de distrofias axonales</i>	268
Discusión	273
Bibliografía	284
3.5. El efecto de la delección de IL-4 sobre la progresión de la patología en un modelo transgénico de Alzheimer	291
Introducción	291
Resultados	294
3.5.1. La delección del gen que codifica para la interleuquina-4 (IL-4) exacerba la patología amiloide en el modelo APP	294
3.5.2. Respuesta inflamatoria en los animales APP/IL4 ^{-/-}	301
3.5.3. Incremento de la patología axonal en los animales APP/IL4 ^{-/-}	311
Discusión	317
Bibliografía	328

4.	DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES	335
	Discusión general	337
	Conclusiones	342
	Conclusions	343
	Bibliografía	344
5.	SUMMARY	345
6.	ANEXOS (Publicaciones)	367
	Anexo 1. Trujillo-Estrada y col., 2014	369
	Anexo 2. Trujillo-Estrada y col., 2013	393
	Anexo 3. Moreno-Gonzalez y col., 2009	411
	Anexo 4. Baglietto-Vargas y col., 2010	435
	Anexo 5. Jimenez y col., 2011	451
	Anexo 6. Sanchez-Varo y col., 2012	471
	Anexo 7. Torres y col., 2012	491

1.

INTRODUCCIÓN	1
Figura 1.1. Alois Alzheimer y su paciente	3
Figura 1.2. Distribución de los tipos de demencia en una muestra poblacional	4
Figura 1.3. Esquema comparativo de un cerebro humano sano y otro de un paciente de EA	7
Figura 1.4. Dibujo realizado por Alois Alzheimer a partir de un preparado histológico del cerebro de un paciente	7
Figura 1.5. Estadios de Braak	8
Figura 1.6. Representación esquemática de la proteína APP	9
Figura 1.7. Estructura de PS1	10
Figura 1.8. Esquema de las vías, no amiloidogénica y amiloidogénica, de procesamiento del APP	11
Figura 1.9. Esquema de la secuencia peptídica de APP, las mutaciones familiares y sitios de procesamiento	12
Figura 1.10. Placas neuríticas de un ratón transgénico de la EA	13
Figura 1.11. Efectos patológicos del A β intraneuronal	15
Figura 1.12. Formación de ovillos neurofibrilares	17
Figura 1.13. Clasificación de la activación microglial	21
Figura 1.14. Posible sucesión de eventos que conforman la hipótesis de la cascada amiloide	24
Figura 1.15. Evolución de un tratamiento farmacológico	34

2.

MATERIAL Y MÉTODOS	61
Figura 2.1. Esquema de las mutaciones familiares del Alzheimer que contiene la secuencia aminoacídica de la proteína APP ₇₅₁ humana en el animal transgénico APP _{SL} y en el doble transgénico PS1 _{M146L} /APP _{751SL}	64
Figura 2.2. Mantenimiento de parentales y generación de animales doble transgénicos PS1/APP	65
Figura 2.3. Fórmula química de la estatina no comercial NST0037 diseñada por Neuron Bio	67
Figura 2.4. Curva de supervivencia de los animales PS1/APPxIL4 ^{-/-} , PS1d9/APP, IL4 ^{-/-} , APP/IL4 ^{-/-} y APP.	68
Figura 2.5. Localización de la formación hipocampal	69
Figura 2.6. Delimitación anatómica de la formación hipocampal compuesta por el hipocampo propio, el giro dentado y el subículo	70
Figura 2.7. Representación esquemática de las aferencias GABAérgicas de las células piramidales del hipocampo propio	71
Figura 2.8. Esquema básico del circuito trisináptico	72
Figura 2.9. Delimitación anatómica de las cortezas retrosplenial granular y visual primaria en secciones coronales seriadas rostro-caudalmente	73
Figura 2.10. Delimitación anatómica de los núcleos del telencéfalo basal	

analizados en este trabajo en secciones coronales seriadas rostro-caudalmente	74
Figura 2.11. Esquema de la orientación de una sección en un plano coronal de un cerebro de ratón	76
Figura 2.12. Esquema de la inmunohistoquímica múltiple para el marcaje diferencial de interneuronas y células principales del subículo a microscopía convencional de campo claro	85
Figura 2.13. Esquema de la inmunohistoquímica doble para microscopía de fluorescencia	86
Figura 2.14. Imagen y esquema representativo de los distintos componentes del sistema de análisis estereológico C.A.S.T.	94
Figura 2.15. ssf: fracción muestreada de las secciones	95
Figura 2.16. hsf: fracción muestreada de altura	95
Figura 2.17. asf: fracción muestreada de área	95
Figura 2.18. Cuantificación del área de las placas mediante el nucleador	98
Figura 2.19. Proceso de binarización con el programa de análisis de imagen Visilog 6.3	100
Figura 2.20. Proceso de cuantificación del porcentaje de área de una región ocupada por las distrofias mediante el empleo del programa Visilog 6.3.	101
Figura 2.21. Cuantificación de la compactación de las placas	101
Figura 2.22. Cuantificación del halo oligomérico de las placas de A β	102
Figura 2.23. Método de cuantificación del índice de esfericidad microglial	103
Figura 2.24. “Open Field Test”	114
Figura 2.25. Protocolo de la prueba de reconocimiento de objetos	115

RESULTADOS **129**

3.

3.1. Early neuronal loss and axonal/presynaptic damage is associated with accelerated amyloid- β accumulation in PS1/APP Alzheimer’s disease mice subiculum

Figure 3.1.1. Significant reduction of subicular SOM-interneurons in PS1/APP mice at early ages	136
Figure 3.1.2. PV-interneurons are resistant to neurodegeneration in PS1/APP subiculum	137
Figure 3.1.3. Loss of principal neurons in the PS1/APP subiculum at early ages	139
Figure 3.1.4. Early accelerated intra- and extracellular A β accumulation in the PS1/APP subiculum	141
Figure 3.1.5. A β load and plaque progression with age in PS1/APP subiculum	142
Figure 3.1.6. Intracellular A β is mostly localized in lysosomal vesicles of principal cells	144
Figure 3.1.7. A β plaques are closely surrounded by axonal/synaptic dystrophies containing phospho-tau and autophagy vesicles	146

Figure 3.1.8. Tight association between extracellular A β and synaptic dystrophies	147
---	-----

3.2. Degeneración de neuronas colinérgicas del telencéfalo basal en modelos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer

Figura 3.2.1. Principales vías de proyección del sistema colinérgico	159
Figura 3.2.2. Neuronas ChAT-positivas en el vBDB	163
Figura 3.2.3. Inmunorreactividad para ChAT en el <i>septum</i> medial	164
Figura 3.2.4. Neuronas ChAT-positivas en el núcleo basal de Meynert	165
Figura 3.2.5. Reducción significativa de neuronas ChAT-positivas en el telencéfalo basal.	166
Figura 3.2.6. Análisis de la expresión de ChAT en el telencéfalo basal de animales WT y PS1/APP	167
Figura 3.2.7. Pérdida neuronal de células ChAT-positivas y p75-positivas en el vBDB y SM	169
Figura 3.2.8. Pérdida neuronal en el NBM de animales PS1/APP a los 12 meses de edad	170
Figura 3.2.9. Pérdida neuronal de células ChAT-positivas en el modelo Thy-Tau22	172
Figura 3.2.10. Inervación colinérgica hipocampal en un animal WT de 4 meses de edad	174
Figura 3.2.11. Alteración de la inervación colinérgica hipocampal en modelos transgénicos de la EA	175
Figura 3.2.12. Reducción del marcador ChAT en el hipocampo de diferentes modelos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer a los 12 meses de edad	176
Figura 3.2.13. Patología distrófica de los axones ChAT-positivos en el hipocampo de ratones PS1/APP	179
Figura 3.2.14. Patología axonal distrófica ChAT en la corteza de ratones PS1/APP	180
Figura 3.2.15. Co-localización de ChAT con diversos marcadores de distrofias en el hipocampo de animales PS1/APP	181
Figura 3.2.16. Los ratones PS1 muestran distrofias ChAT-positivas en el hipocampo y la corteza a los 12 meses de edad	182
Figura 3.2.17. Las células colinérgicas del telencéfalo basal no expresan hAPP en los ratones PS1/APP ni acumulan A β intracelular	184
Figura 3.2.18. Deposición de placas amiloides en el NBM de animales PS1/APP	185
Figura 3.2.19. Placas amiloides en el SM y vBDB de animales PS1/APP	186
Figura 3.2.20. Activación glial en el telencéfalo basal de animales PS1/APP de 12 meses de edad	187
Figura 3.2.21. Interneuronas y distrofias axonales ChAT-positivas en la corteza cerebral de ratones transgénicos PS1/APP	189
Figura 3.2.22. Reducción de interneuronas positivas para ChAT en la corteza	

visual primaria (V1) de animales PS1/APP a los 12 meses de edad	190
Figura 3.2.23. Déficit de comportamiento en animales transgénicos PS1/APP y PS1 de 12 meses de edad	192
Figura 3.2.24. Proceso degenerativo en la EA familiar con mutaciones en <i>PS1</i>	198
3.3. In vivo modification of Abeta plaque toxicity as a novel neuroprotective lithium-mediated therapy for Alzheimer's disease pathology	
Figure 3.3.1. Lithium treatment improved the behavioral/memory deficiencies of PS1/APP mice	218
Figure 3.3.2. Lithium treatment improved the behavioral/memory deficiencies of PS1/APP mice	219
Figure 3.3.3. Lithium treatment avoided neuronal loss in the hippocampus of PS1/APP mice	221
Figure 3.3.4. Lithium treatment reduced dystrophic pathology in the hippocampus of PS1/APP mice	222
Figure 3.3.5. Lithium treatment reduced the dystrophic pathology associated to Abeta plaques	224
Figure 3.3.6. Lithium treatment reduced the dystrophic pathology associated to Abeta plaques	225
Figure 3.3.7. Lithium treatment reduced the size of the extracellular Abeta plaques	227
Figure 3.3.8. Lithium treatment increased the compaction of the extracellular Abeta plaques	228
Figure 3.3.9. Lithium treatment reduced the oligomeric halo of the extracellular Abeta plaques	229
Figure 3.3.10. Lithium treatment decreased the Abeta toxicity	230
Figure 3.3.11. Lithium increased the astrocyte activation	232
Figure 3.3.12. Lithium increased the astrocyte activation and the Hsps levels	233
Figura suplementaria 1. El tratamiento con litio evita la pérdida neuronal colinérgica en el NBM de ratones PS1/APP	238
Figura suplementaria 2. El tratamiento con litio promueve la protección de los plexos axonales colinérgicos y disminuye la formación de distrofias en el hipocampo de animales PS1/APP	239
Figura suplementaria 3. El tratamiento con litio evita la pérdida hipocampal de ChAT en el modelo transgénico PS1	241
3.4. Evaluación preclínica en un modelo transgénico de Alzheimer del potencial terapéutico de una nueva estatina	
Figura 3.4.1. Representación esquemática de las principales etapas implicadas en la biosíntesis del colesterol	246
Figura 3.4.2. El tratamiento con el compuesto NST0037 reduce significativamente la carga amiloide	249

Figura 3.4.3. El compuesto NST0037 reduce significativamente la carga amiloide fibrilar del hipocampo	250
Figura 3.4.4. Estudio del efecto de NST0037 sobre la cantidad y tamaño de las placas fibrilares en CA1	252
Figura 3.4.5. El tratamiento con el compuesto NST0037 reduce notablemente la carga de A β 42	253
Figura 3.4.6. El tratamiento con el compuesto NST0037 reduce la carga de A β 42 en el hipocampo del modelo PS1/APP	254
Figura 3.4.7. El tratamiento con NST0037 reduce la carga amiloide en el subículo del modelo PS1/APP	255
Figura 3.4.8. El tratamiento con NST0037 produce una disminución de los depósitos de Abeta oligomérico	257
Figura 3.4.9. El tratamiento con la estatina NST0037 reduce la patología axonal asociada a placas	259
Figura 3.4.10. El tratamiento con NST0037 reduce significativamente la cantidad de distrofias axonales	260
Figura 3.4.11. Correlación positiva entre la carga de Abeta y las distrofias APP	261
Figura 3.4.12. El tratamiento con NST0037 disminuye la acumulación del marcador de autofagia LC3b en las distrofias axonales asociadas a placas	264
Figura 3.4.13. El tratamiento con NST0037 protege de la pérdida de interneuronas SOM-positivas en el hipocampo de ratones transgénicos	266
Figura 3.4.14. Estudio cuantitativo del efecto de NST0037 sobre la población de interneuronas SOM-positivas en el hipocampo de ratones transgénicos	267
Figura 3.4.15. El tratamiento con NST0037 disminuye la patología axonal colinérgica en el hipocampo	269
Figura 3.4.16. Estudio cuantitativo de la patología axonal colinérgica en la región de CA1	270
Figura 3.4.17. Estudio cuantitativo de la patología axonal colinérgica en el subículo	271
Figura 3.4.18. El tratamiento con NST0037 no protege a la población colinérgica del núcleo basal de Meynert	272
Figura 3.4.19. El tratamiento disminuye el procesamiento de APP a través de la vía amiloidogénica	275
Figura 3.4.20. El tratamiento no afecta a los niveles de β -secretasa	275
Figura 3.4.21. La estatina disminuye la actividad γ -secretasa	276
Figura 3.4.22. El tratamiento redujo los niveles de expresión de APOE	278
Figura 3.4.23. El tratamiento redujo la pérdida de expresión NPY	281
3.5. Efecto de la delección de IL-4 sobre la progresión de la patología en un modelo modelo transgénico de Alzheimer	291
Figura 3.5.1. Aumento de la patología amiloide en el hipocampo de los animales APP/IL4 ^{-/-}	296

Figura 3.5.2. Patología amiloide en la región de CA1 y el giro dentado de los animales APP y APP/IL4 ^{-/-}	297
Figura 3.5.3. La deficiencia de IL-4 induce un aumento significativo de la carga amiloide	298
Figura 3.5.4. Estudio comparativo del tamaño y la densidad de las placas amiloides durante la progresión de la patología en CA1	300
Figura 3.5.5. Incremento en los niveles de Aβ en los animales APP/IL4 ^{-/-}	301
Figura 3.5.6. Aumento de la activación microglial en el hipocampo en los animales APP-APP/IL4 ^{-/-}	303
Figura 3.5.7. Activación microglial en los animales APP-APP/IL4 ^{-/-}	304
Figura 3.5.8. La microglía activada muestra un aspecto menos ramificado en los animales APP/IL4 ^{-/-}	305
Figura 3.5.9. Activación microglial en el subículo de los animales APP-APP/IL4 ^{-/-}	307
Figura 3.5.10. Incremento en los niveles de expresión (ARNm) para los marcadores microgliales Iba1 y CD45 en los animales APP/IL4 ^{-/-}	308
Figura 3.5.11. La microglía muestra un fenotipo de activación clásico M1 en los animales APP/IL4 ^{-/-}	309
Figura 3.5.12. Activación astrogliar en el hipocampo de los animales APP-APP/IL4 ^{-/-}	310
Figura 3.5.13. Activación glial alrededor de las placas en el hipocampo	312
Figura 3.5.14. Activación glial y patología distrófica alrededor de las placas en el hipocampo	313
Figura 3.5.15. Aumento de la patología axonal en el hipocampo de los animales APP/IL4 ^{-/-}	315
Figura 3.5.16. Aumento de distrofias axonales positivas para fosfo-Tau (AT8) en el hipocampo de animales APP/IL4 ^{-/-}	316
Figura 3.5.17. Patología distrófica asociada a placas de Abeta en los animales APP-APP/IL4 ^{-/-}	318
Figura 3.5.18. Niveles de oligómeros solubles de Abeta en el hipocampo	319
Figura 3.5.19. La expresión del marcador microglial CD36 está reducida en los animales APP/IL4 ^{-/-}	321
Figura 3.5.20. La activación microglial conlleva efectos beneficiosos y perjudiciales a lo largo de la EA	326
Figura 3.5.21. Modelo de acción de las estrategias terapéuticas centradas en la polarización microglial	327

1.

INTRODUCCIÓN**1****Tabla 1.1.** Resumen de los principales modelos transgénicos murinos para la EA 32**Tabla 1.2.** Resultados obtenidos en ensayos en fase clínica 3 con drogas centradas en el A β 36

2.

MATERIAL Y MÉTODOS**61****Tabla 2.1.** Relación de marcadores estudiados mediante inmunohistoquímica 80**Tabla 2.2.** Relación de anticuerpos primarios utilizados en los estudios inmunohistoquímicos 81**Tabla 2.3.** Relación de anticuerpos secundarios utilizados en los estudios inmunohistoquímicos de microscopía óptica de campo claro 83**Tabla 2.4.** Relación de anticuerpos secundarios utilizados en los estudios inmunohistoquímicos de microscopía de fluorescencia 86**Tabla 2.5.** Complejos de estreptavidina conjugada a fluorocromo 87**Tabla 2.6.** Relación de anticuerpos secundarios acoplados a oro utilizados en los estudios inmunohistoquímicos de MET 93**Tabla 2.7.** Pasos para la purificación de ARN usando el sistema *ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation* (Applied Biosystems) 105**Tabla 2.8.** Reactivos utilizados para la preparación de la mezcla de reacción 2X (Retromix) 107**Tabla 2.9.** Marcadores analizados a nivel de ARNm mediante RT-PCR 107**Tabla 2.10.** Relación de los reactivos empleados para la amplificación por PCR a tiempo real empleando SYBR-green I 109**Tabla 2.11.** Relación de los reactivos empleados para la amplificación por PCR a tiempo real empleando sondas Taqman 109**Tabla 2.12.** Programa predeterminado de amplificación para PCR a tiempo real 110**Tabla 2.13.** Secuencia de cebadores empleados en la PCR 110**Tabla 2.14.** Sondas Taqman para RT-PCR 110**Tabla 2.15.** Relación de reactivos y volúmenes necesarios para obtener geles de poliacrilamida-SDS (14% de acrilamida) en tampón Tricina 111**Tabla 2.16.** Relación de reactivos y volúmenes necesarios para obtener geles de poliacrilamida-SDS (10% de acrilamida) en tampón Glicina 111**Tabla 2.17.** Marcadores detectados mediante *Western-blot* 112

3.

RESULTADOS**129****3.1. Early neuronal loss and axonal/presynaptic damage is associated with accelerated amyloid- β accumulation in PS1/APP Alzheimer's disease mice subiculum****Table 3.1.1.** Summary of the mayor neuropathological findings in the PS1M146/APPSweLondon transgenic model 148

3.2. Degeneración de neuronas colinérgicas del telencéfalo basal en modelos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer

Tabla 3.2.1. Resumen de los déficits colinérgicos descritos en diferentes modelos animales de la EA	159
Tabla 3.2.2. Funciones en las que está implicado el telencéfalo basal	203

3.3. In vivo modification of Abeta plaque toxicity as a novel neuroprotective lithium-mediated therapy for Alzheimer's disease pathology

Tabla 3.3.1. Abeta accumulation was not modified in the lithium treated PS1/APP mice	226
---	-----

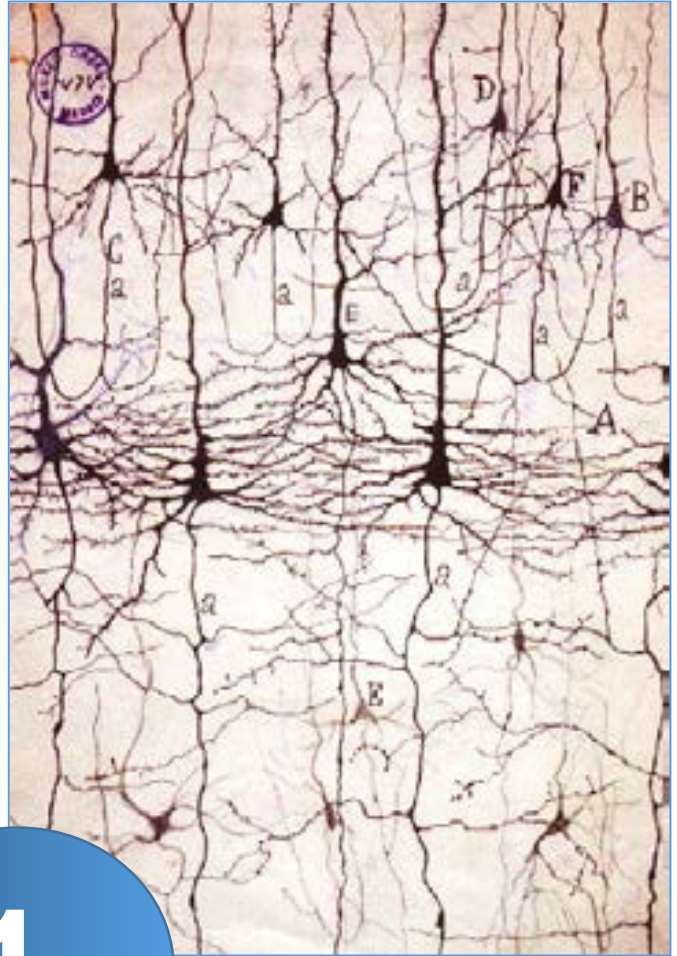
3.4. Evaluación preclínica en un modelo transgénico de Alzheimer del potencial terapéutico de una nueva estatina

Tabla 3.4.1. Datos de densidad numérica (células/mm ³) para la población de interneuronas somatostatina	265
--	-----

4. DISCUSIÓN 335

4.

Tabla 4.1. Ventajas y limitaciones del uso de modelos animales transgénicos en la investigación de la enfermedad de Alzheimer	337
--	-----



1.

Introducción

1.1.

La enfermedad de Alzheimer

Las características clínicas y anatomopatológicas de la enfermedad de Alzheimer (EA) fueron descritas por primera vez en 1906 por el psiquiatra y neuropatólogo alemán Alois Alzheimer¹. Sus hallazgos se basaron en el estudio de una paciente de 51 años, llamada Auguste Deter (Fig. 1.1), que presentaba un cuadro grave de delirios, pérdida de memoria, desorientación y trastornos de la conducta y el lenguaje, y que finalmente falleció en estado de total invalidez tras cuatro años y medio de evolución clínica.



Figura 1.1. Alois Alzheimer y su paciente. Auguste Deter (1850-1906) a la izquierda y el Dr. Alois Alzheimer (1864-1915) a la derecha.

La EA se puede definir como un proceso neurodegenerativo progresivo e irreversible caracterizado por la pérdida progresiva de memoria, de habilidades intelectuales y de razonamiento, así como por desorientación espacio-temporal, cambios de humor, alteraciones conductuales, afasia (disminución progresiva de la capacidad del lenguaje), apraxia (alteración de los gestos e incapacidad de realizar tareas rutinarias) y agnosia (incapacidad de reconocimiento de personas o cosas) (Reiman y Caselli, 1999; Van Strien

¹ El 3 de Noviembre de 1906 Alzheimer dio a conocer sus hallazgos en el 37th Meeting of South-West German Psychiatrists in Tübingen con una conferencia titulada “*Sobre un proceso patológico peculiar grave de la corteza cerebral*”. Un año más tarde se publicaron en *Alzheimer A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin., 64:146-148.*

y col., 2009). Estas alteraciones se deben a daños selectivos en regiones cerebrales implicadas en estos procesos, tales como el hipocampo, la corteza entorrinal, la amígdala y el telencéfalo basal. El curso clínico de la EA suele durar 8-10 años, pudiendo llegar hasta los 25 (Gies y Lessick, 2009). La muerte del paciente suele atribuirse a enfermedades no relacionadas o indirectamente relacionadas, pero un 20% de las muertes son directamente atribuibles a las demencias o a las complicaciones en la fase terminal (Reiman y Caselli, 1999) como la malnutrición y la neumonía.

En la actualidad, el Alzheimer es la forma más común de demencia (50-75%; Fig. 1.2) entre las personas mayores de 65 años². La prevalencia de la enfermedad está por debajo del 1% en individuos menores de 65, pero muestra un incremento casi exponencial con la edad, y en personas de 85 años la incidencia es del 30% en el mundo occidental, ascendiendo al 63,9% en personas mayores de 90 años (Prince y col., 2013). El incremento de la población de edad avanzada, debido al aumento de la esperanza de vida, hace que esta patología se haya convertido en el tercer problema de salud más grave en los países desarrollados (detrás de los accidentes cardiovasculares y el cáncer). Existen alrededor de 800.000 enfermos diagnosticados en España y 35 millones a nivel mundial. Se calcula que en el año 2050, 115 millones de personas en el mundo se encontrarán afectadas por la EA (Neugroschl y Sano, 2010; ver http://www.alz.org/downloads/facts_figures_2014.pdf).



Figura 1.2. Distribución de los tipos de demencia en una muestra poblacional.
Fuente: Estudio Poblacional de Prevalencia de Demencia. Tomado del informe “Estado del arte de la enfermedad de Alzheimer en España”, realizado por PWC (2013).

La ausencia de marcadores biológicos para la enfermedad de Alzheimer hace que el análisis neuropatológico *post mortem* sea crucial para el diagnóstico definitivo de la enfermedad. El Alzheimer es, hoy, una enfermedad incurable, y aunque existen fármacos que mejoran los síntomas, ninguno es totalmente efectivo (ver Apdo. 1.3).

1.1.1. Tipos de Alzheimer. Factores de riesgo.

Se diferencian dos formas de la enfermedad según la edad de inicio, su incidencia y las causas de aparición, aunque ambos tipos cursan con los mismos síntomas y lesiones histopatológicas (ver revisiones Gomez-Isla y col., 2008; Perl, 2010; Ballard y col., 2011; Bagyinszky y col., 2014):

² Datos obtenidos del estudio *World Alzheimer Report 2014* (<http://www.alz.co.uk/research/world-report-2014>)

- I. Alzheimer esporádico: (95-98% de los casos). Aparece alrededor de los 60-65 años de edad. Es de origen multifactorial y el principal factor de riesgo es la edad (ver revisión Ballard y col., 2011).
- II. Alzheimer familiar (FAD; del inglés *Familial Alzheimer Disease*): (3-5% de los casos). También conocido como presenil o de inicio temprano, se caracteriza por su aparición entre los 35 y 40 años de edad. Se debe a la transmisión autosómica dominante, con un 100% de penetración, de mutaciones en los genes que codifican para la Proteína precursora amiloide (APP), la Presinilina 1 (PS1) o la Presinilina 2 (PS2) (ver revisiones O'Brien y Wong, 2011; Karch y col., 2014; Calero y col., 2015):
 - A. En el gen *APP* se describió la primera mutación relacionada con el Alzheimer, pero afecta a un bajo porcentaje de personas (10%). Este gen se localiza en el cromosoma 21 (Goate y col., 1991) y se han descrito 32 mutaciones relacionadas con la enfermedad de Alzheimer (para detalle ver www.molgen.ua.ac.be/ADmutations/). De hecho, su duplicación (como ocurre en el Síndrome de Down) causa Alzheimer a edades tempranas (ver revisión Thinakaran y Koo, 2008).
 - B. El gen *PS1* se localiza en el cromosoma 14. Su mutación es la causa más común de las formas familiares de la EA (30-50% antes de los 55 años, 70% del Alzheimer familiar total; Sherrington y col., 1995), conociéndose 185 mutaciones distintas, entre ellas la F176L que portaba Auguste Deter (Müller y col., 2013).
 - C. El gen *PS2* se localiza en el cromosoma 1 (Rogaev y col., 1995). Se han descrito alrededor de 14 mutaciones en este gen asociadas con el Alzheimer (Czech y col., 2000).

Además de mutaciones en estos genes, la EA se asocia con determinados porlormorfismos genéticos (ver revisiones Karch y col., 2014; Calero y col., 2015):

- D. *Apolipoproteína E (APOE)*. Se localiza en el cromosoma 19. Existen tres isoformas de esta proteína, E2, E3 (la más común) y E4³ (Strittmatter y col., 1993; Yu y col., 2014). Parece actuar como una chaperona del A β , capaz de estabilizar los depósitos fibrilares y evitar su eliminación (Bales y col., 1999) y parece intervenir en el proceso neuroinflamatorio (Tai y col., 2015) y causar alteraciones sinápticas, entre otros efectos (Yu y col., 2014).
- E. *CLU*. Este gen se localiza en el cromosoma 8 y codifica para parte de la cadena β de la proteína clusterina (conocida como Apolipoproteína J). Su

³ La isoforma E4 de la APOE está considerada el mayor factor de riesgo del Alzheimer esporádico, tras la edad, incrementando su riesgo en tres veces en individuos que portan una copia del alelo y en 15 veces en individuos homocigotos. Hay pruebas de que la herencia del alelo ϵ 2 puede conferir protección contra el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (Selkoe, 2001).

expresión está incrementada en varias regiones cerebrales de pacientes de la EA (Lambert y col., 2009). Esta proteína, secretada por astrocitos, forma complejos con el A β soluble convirtiéndolo a formas insolubles y formando complejos que atraviesan la barrera hematoencefálica (Boggs y col., 1996).

- F. *PICALM* (del inglés “*phosphatidyl inositol-binding clathrin assembly protein*”; Harold y col., 2009). Gen localizado en el cromosoma 11. En la EA podría modular la autofagia (Moreau y col., 2013) y participar en el procesamiento de APP a través de la ruta endocítica.
- G. *CRI* (Lambert y col., 2009). Se localiza en el cromosoma 1. Codifica para el receptor del complemento 1 (receptor de C3b) expresado por la microglía (Mosher y Wyss-Coray, 2014). Está ligado a la EA a través de la activación, inducida por el A β fibrilar, de la cascada del complemento.
- H. Otros genes (ver revisión Calero y col., 2015): *α 2-macroglobulina* (Flachsbarth y col., 2010), *fosfolipasa A2 (PLA2)*; Cordeiro y col., 2010), *sortilina-1 (SORL1)*; Rogaeva y col., 2007), *TREM2⁴* (Guerreiro y col., 2013; Jonsson y col., 2013), *ADAM10* (Kim y col., 2009), *fosfolipasa D3 (PLD3)*; Cruchaga y col., 2014), etc.

Además, existen una gran cantidad de factores de riesgo para la EA (ver revisión Blennow y col., 2006; Scarmeas y col., 2009): el género, siendo mayor la incidencia en la mujer, para lo que se han propuesto factores hormonales, ya que los estrógenos disminuyen la producción de A β en cultivos celulares (Baum, 2005), así como su mayor expectativa de vida; otras enfermedades como la diabetes mellitus tipo II, ya que la insulina modula la plasticidad sináptica, la memoria y el aprendizaje, y regula el metabolismo de A β y de Tau (Zhu y col., 2005; Sato y Morishita, 2014), o enfermedades cerebrovasculares (ver Apdo. 1.1.7.4; Deschaintre y col., 2009); la dieta (Luchsinger y Mayeux, 2004); la actividad física y el nivel educacional.

1.1.2. Neuropatología

La EA se caracteriza por unos rasgos anatomopatológicas distintivos (para revisión ver Perl, 2010; Claeysen y col., 2012). Los principales cambios macroscópicos característicos del cerebro incluyen una importante atrofia cortical, con adelgazamiento de las circunvoluciones, ensanchamiento de los surcos, engrosamiento de las meninges, dilatación de las cavidades ventriculares y disminución del peso y volumen cortical (Fig. 1.3). La atrofia cerebral se puede analizar mediante neuroimagen (resonancia magnética)

⁴ *TREM 2* (del inglés *triggering receptor expressed on myeloid cells 2*) es un receptor transmembrana tipo I expresado por las células microgliales. Media dos rutas de señalización: la regulación de la fagocitosis y la supresión de la reactividad inflamatoria (Colonna, 2003).

para mejorar el diagnóstico precoz y ayudar a predecir el curso de la enfermedad (Nasrallah y Wolk, 2014; Eskildsen y col., 2015).

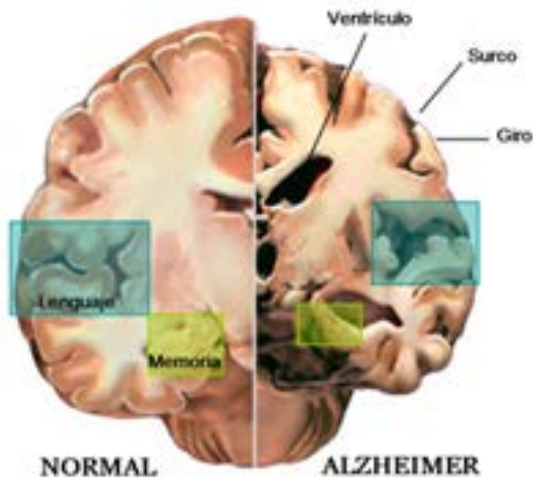


Figura 1.3. Esquema comparativo de un cerebro humano sano (izquierda) y otro de un paciente de EA (derecha). Se aprecia como el cerebro con Alzheimer posee un menor volumen y muestra dilatación ventricular. La atrofia afecta a los lóbulos temporales, frontales, parietales y occipitales. Las regiones donde residen las funciones de memoria (hipocampo; resaltado en verde) y lenguaje (áreas de Broca y de Wernicke; resaltado en azul) son las más afectadas.

A nivel microscópico, las lesiones histopatológicas características de esta enfermedad son (revisado en Gomez-Isla y col., 2008; Perl, 2010; Serrano-Pozo y col., 2011):

1.- Placas seniles (depósitos extracelulares) formadas por la proteína β -amiloide ($A\beta$), y ovillos neurofibrilares intracelulares (NFTs, del inglés *Neurofibrillary Tangles*) formados por la proteína Tau hiperfosforilada. Estas dos alteraciones tisulares, descritas por Alois Alzheimer hace más de 100 años (Fig. 1.4), constituyen, aún en la actualidad, las lesiones histopatológicas *post mortem* para el diagnóstico definitivo de la enfermedad (ver revisión Duyckaerts y col., 2009).

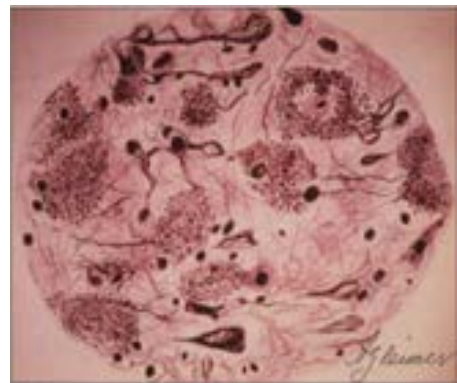


Figura 1.4. Dibujo realizado por Alois Alzheimer a partir de un preparado histológico del cerebro de un paciente. Se aprecian las placas seniles y los NFTs.

2.- Además, existe una pérdida significativa de neuronas y contactos sinápticos en áreas cerebrales selectivamente vulnerables (Gomez-Isla y col., 1996), que en muchas ocasiones están implicadas en el procesamiento de la información y la adquisición de la memoria, como por ejemplo, las neuronas de la región CA1 del hipocampo (West y col., 1994). En la primera fase de la EA, las neuronas colinérgicas del telencéfalo basal (Whitehouse y col., 1981) y las adrenérgicas del *locus coeruleus* (German y col., 1992) son las más afectadas.

3- También, es característica la presencia de un proceso neuroinflamatorio con activación glial (ver revisión Heneka y col., 2015b), y de cuerpos de Hirano, inclusiones citoplasmáticas eosinófilas que presentan filamentos de actina con proteínas asociadas, entre las que se encuentra la proteína Tau (Hirano, 1994).

Los cambios neuropatológicos del Alzheimer aparecen, inicialmente, en la corteza transentorrinal (Fig. 1.5) y progresan hacia el hipocampo, implicándose finalmente las áreas neocorticales (Braak y Braak, 1991).

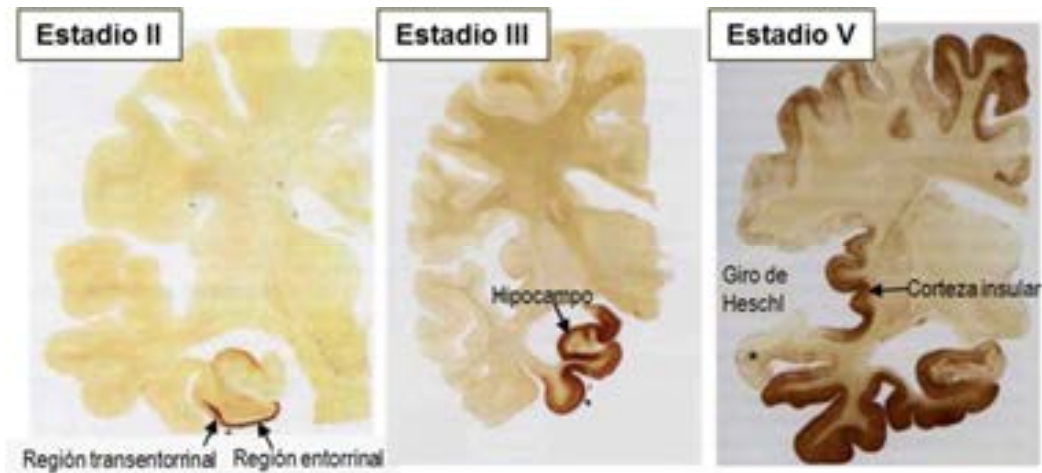


Figura 1.5. Estadios de Braak. Braak y Braak (1991) han propuesto la progresión de la patología neurofibrilar en la corteza cerebral, iniciándose en las cortezas transentorrinal y entorrinal (estadios I y II), siguiendo hacia el hipocampo (estadios III y IV), alcanzando, finalmente, la isocorteza (estadios V y VI). Las zonas afectadas por la EA están implicadas en los mecanismos de memoria y aprendizaje, mientras que la corteza motora y sensorial no parecen estar alteradas, permaneciendo intactas las funciones en las que están implicadas incluso en los estadios más avanzados de la enfermedad (Modificado de Braak y Braak, 1991).

1.1.3. Biogénesis y degradación del β -amiloide

El péptido $A\beta$, principal constituyente de las placas amiloides, es generado por proteólisis de la Proteína precursora amiloide (APP).

1.1.3.1. APP

La proteína APP (Fig. 1.6) es una glicoproteína integral de membrana de tipo I, que posee un largo dominio extracelular N-terminal globular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular corto (ver revisión Rajendran y Annaert, 2012). El gen *APP*, localizado en el cromosoma 21, consta de 18 exones que pueden generar tras su procesamiento 10 isoformas alternativas⁵. Una vez sintetizada en el retículo endoplasmático (RE), la forma madura glicosilada de esta proteína es dirigida desde la red de Trans-Golgi (TG) a la membrana plasmática donde puede ser procesada o endocitada. Mayoritariamente, suele encontrarse en los sistemas membranosos (RE-Golgi-endosomas-lisomas) (ver revisión Thinakaran y Koo, 2008; Zhang y col., 2011).

La función fisiológica de APP se desconoce, ya que la ausencia de este gen no provoca ninguna sintomatología debido a la existencia de moléculas homólogas (APLP1 y APLP2, del inglés *amyloid precursor-like protein*). Esta proteína podría estar implicada en

⁵ De las isoformas de APP que se pueden generar, tres son las más frecuentes: APP695 (con 695 aminoácidos), APP751 y APP770 (Tanzi y col., 1988; revisado en Yamada y Nabeshima, 2000).

la adhesión y señalización celular (Wolfe y Guenette, 2007), el transporte de metales, la unión a matriz extracelular, el crecimiento de neuritas y del cono axónico neuronal, la migración neuronal, la potenciación a largo plazo (LTP) y la señalización intracelular. Además, se ha descrito que puede tener propiedades neuroprotectoras, antioxidantes y tróficas (Thinakaran y Koo, 2008; O'Brien y Wong, 2011; Rajendran y Annaert, 2012).

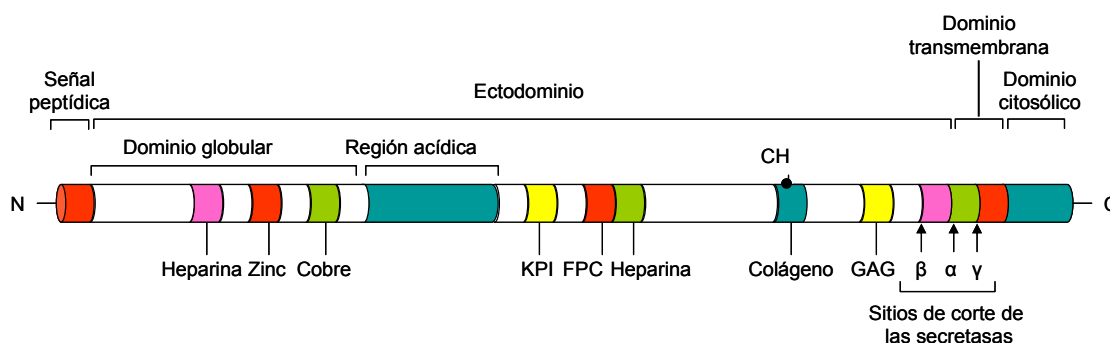


Figura 1.6. Representación esquemática de la proteína APP. Esta proteína contiene numerosos sitios de unión a moléculas propias de la matriz extracelular, como la heparina o el colágeno. En la zona C-terminal se encuentra la zona de corte de las secretasas α , β y γ , que generarán la escisión del péptido A β . KPI: inhibidor de la serín proteasa Kunitz; FPC: factor promotor de crecimiento; CH: sitio de unión a carbohidratos; GAG: sitio de unión a glucosaminoglucanos (Modificado de Evin y Weidemann, 2002).

1.1.3.2. Presenilinas: PS1 y PS2

Las mutaciones en *PS1* y *PS2* provocan la forma familiar del Alzheimer y representan el 90% de las mutaciones identificadas. Tanto PS1 (Fig. 1.7) como PS2, son proteínas integrales de membrana (de 467 y 448 aminoácidos, respectivamente, con el 65% de la secuencia idéntica). Se encuentran ubicadas en el RE, en el Golgi, lisosomas (Pasternak y col., 2003), endosomas, vacuolas autofágicas (Yu y col., 2004), mitocondrias y la membrana plasmática (Vetrivel y col., 2006). Ambas proteínas se expresan ampliamente durante el desarrollo y se encuentran ampliamente distribuidas. Sin embargo, en el cerebro adulto, se expresan predominantemente en neuronas, aunque también pueden encontrarse en astrocitos reactivos (ver revisión Elder y col., 2010a).

A las Presenilinas se les atribuyen varias funciones, como el control de la apoptosis, homeostasis del calcio, crecimiento neurítico y plasticidad sináptica. Recientemente, se ha descrito un papel esencial para PS1 en el procesamiento proteolítico a nivel lisosomal, ya que interviene en la acidificación de los lisosomas y la activación de la catepsina (Lee y col., 2010). Además, interviene en el procesamiento de APP al formar parte de un complejo proteico denominado secretasoma, con actividad γ -secretasa, que pertenece a la familia de proteasas de corte intramembrana (Wolfe y Kopan, 2004), y consiste en un complejo proteico de alto peso molecular formado por la agrupación de las presenilinas (componente catalítico) con otras proteínas como Nicastrina (Li y col., 2009a; De Strooper, 2010; O'Brien y Wong, 2011). La γ -secretasa tiene un amplio espectro de

sustratos proteicos de membrana además de APP, como Notch1 y sus homólogos (Vetrivel y col., 2006; Li y col., 2009a).

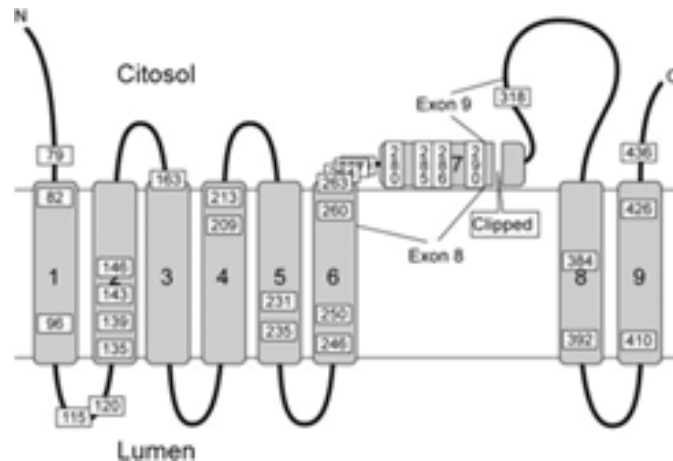


Figura 1.7. Estructura de PS1 (PS2 es similar). Se trata de una proteína integral de membrana, con entre 6 y 8 dominios transmembranales y los dominios N- y C-terminal citosólicos (Czech y col., 2000; Chavez-Gutierrez y col., 2012). Se indican los sitios donde se han encontrado mutaciones (para lista detallada ver Hardy, 1997). Se observa cómo, a diferencia de lo que ocurre con las mutaciones para APP (ver Fig. 1.9), las mutaciones en PS1 no se encuentran localizadas sino distribuidas por toda la secuencia de la proteína. Los residuos codificados por el exón 9 son los que se pierden, por *splicing* alternativo, en la mutación $\Delta 9$ (Tomado de Hutton y Hardy, 1997).

1.1.3.3. Procesamiento de APP

Durante el envejecimiento normal y, de forma más acusada, en la EA, se originan péptidos de $A\beta$, que formarán las placas seniles, a partir del procesamiento de APP. Existen dos vías alternativas de procesamiento postraduccional de esta proteína (ver revisiones Zhang y col., 2011; Rajendran y Annaert, 2012) (Fig. 1.8):

I. Ruta no amiloidogénica: ruta predominante en la mayoría de las células. Se denomina así porque la proteólisis se produce dentro de la región que da lugar al $A\beta$, evitando su producción. En esta vía, que ocurre mayoritariamente en la membrana plasmática, se produce la fragmentación de APP por la acción de la α -secretasa, generando $sAPP\alpha$, que es un fragmento soluble que se libera dentro del lumen vesicular o al espacio extracelular y al que se le atribuyen propiedades neuroprotectoras y neurotróficas, al actuar a través de receptores de insulina (Hiltunen y col., 2009). Además, se genera un fragmento C-terminal o CTF, denominado C83, que queda unido a la membrana. Este último es sustrato de la γ -secretasa, complejo enzimático del que forma parte la Presenilina, que actúa dentro de la membrana (mediante actividad, primero, endopeptidasa y carboxipeptidasa, después; Chavez-Gutierrez y col., 2012) dando lugar a los péptidos p3 (que puede encontrarse formando parte de las placas, pero que, en principio, no es tóxico) y AICD o dominio intracelular de APP (llamado también p7), que es citosólico, por lo que podría tener una función en la regulación de la transcripción génica (De Strooper, 2010).

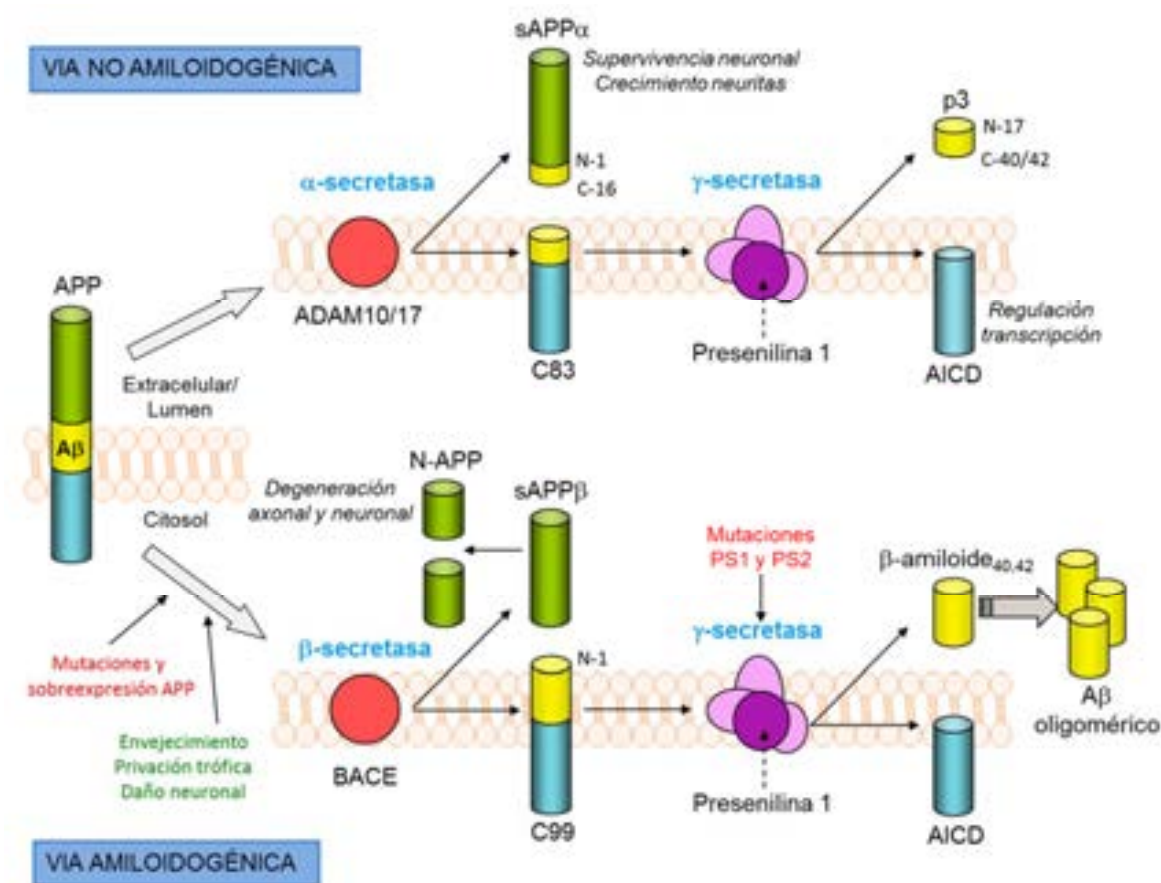


Figura 1.8. Esquema de las vías, no amiloidogénica y amiloidogénica, de procesamiento del APP. En la primera vía, el metabolismo del APP se produce mediante la actividad secuencial de la α - (ADAM, del inglés *A desintegrin and metalloprotease*) y γ -secretasa, que generan sAPP α , p3 y AICD. En la vía amiloidogénica, el procesamiento del APP se lleva a cabo por la acción de la β -secretasa (BACE, del inglés *beta-site APP-cleaving enzyme 1*), primero, y por la γ -secretasa, después, generándose los fragmentos sAPP β (cuya función es desconocida), A β y AICD. La región que formará el A β tras el procesamiento del APP se encuentra tanto en el dominio extracelular como en el transmembrana, provocando que éste tenga propiedades de agregación, ya que una parte de la molécula tiene características hidrofóbicas (Adaptado de Kim y Tsai, 2009).

II. Ruta amiloidogénica: Es una ruta alternativa de procesamiento de APP, minoritaria en la mayoría de los tipos celulares (excepto en las neuronas), que genera péptidos A β . En esta vía actúan consecutivamente la β - y γ -secretasa originando péptidos de β -amiloide (de 39-43 aminoácidos) (ver revisión Rajendran y Annaert, 2012). La actividad β -secretasa ha sido atribuida a la aspartil proteasa BACE-1 (Vassar y col., 2009). Este procesamiento ocurre, principalmente, en los compartimentos subcelulares, ya que la APP es reinternalizada desde la membrana plasmática en un compartimento endosomal que contiene las proteasas BACE-1 y γ -secretasa, o bien pasa a dicho compartimento desde la red del trans Golgi a lo largo del sistema Golgi-endosoma-lisosoma, siendo éstos posibles puntos de generación del A β (Greenfield y col., 1999; Thinakaran y Koo., 2008; Zhang y col., 2011). A favor de este modelo está el hecho de que se bloquea la liberación del 80% del A β evitando la endocitosis de APP desde la superficie celular (ver revisión

O'Brien y Wong, 2011). Además, se ha sugerido que la producción de A β podría ocurrir principalmente en las llamadas balsas lipídicas (*lipid rafts*) (ver revisión Selkoe, 2008).

1.1.3.4. El péptido β -amiloide (A β)

El péptido A β (4 kDa) se origina a partir de la región de APP localizada tanto en el dominio extracelular como en el transmembrana, lo que le confiere propiedades agregativas. Normalmente, el A β acaba en Val₄₀ (A β ₄₀) en el extremo C-terminal, pero un pequeño porcentaje (10%) lo hace en Ala₄₂ (A β ₄₂), aumentando así su hidrofobicidad, por lo que tiende a agregarse y formar fibrillas. Las mutaciones descritas en el Alzheimer familiar (Fig. 1.9) actúan aumentando la producción relativa de A β ₄₂ (Ashe y Zahs, 2010).

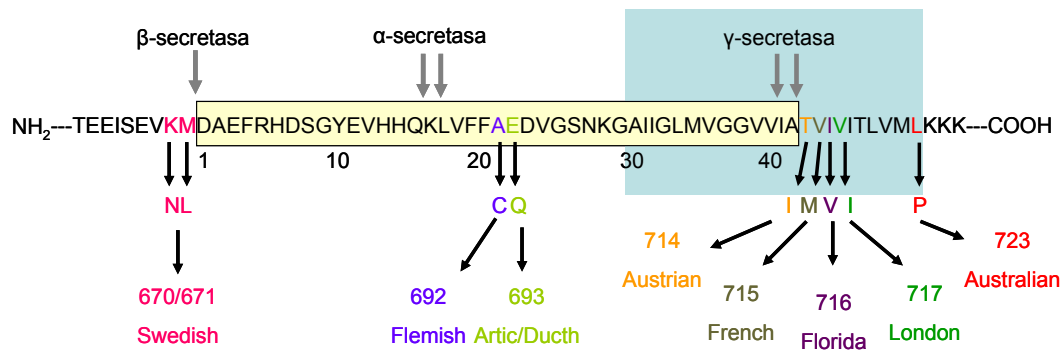


Figura 1.9. Esquema de la secuencia peptídica de APP, las mutaciones familiares y sitios de procesamiento. La secuencia del A β está encuadrada en la caja de color amarillo. El rectángulo azul delimita el dominio de membrana. Las flechas de arriba indican la zona de corte de las secretasas. Las mutaciones puntuales que se han encontrado en casos de la EA familiar están destacadas en color; la mayoría de ellas están alrededor del sitio de procesamiento de la γ -secretasa y aumentan la producción de A β ₄₂, aunque la más famosa (APP_{SWE}) causa un cambio de aminoácido en la zona adyacente al punto de corte de β -secretasa y actúa aumentando el procesamiento por BACE. Las mutaciones *Flemish* y *Artic/Dutch* actúan incrementando la agregación de A β . Recientemente, Jonsson y col. (2012), han descrito una mutación en APP (A673T), cerca del sitio de corte de β -secretasa, asociada con una reducción en el riesgo de padecer la enfermedad (Modificado de Evin y Weidemann, 2002).

La producción de A β no es únicamente un proceso patológico, sino que se genera de forma normal y este péptido aparece tanto en el plasma como en el líquido cefalorraquídeo de individuos sanos. De hecho sus niveles endógenos parecen seguir el ritmo circadiano, siendo mayores durante la vigilia (Kang y col., 2009). Así, incluso durante el envejecimiento normal, aunque de forma más acusada en la EA, se originan péptidos A β insolubles que se depositan en el parénquima cerebral y en la pared de los vasos sanguíneos cerebrales (Selkoe, 2004; Gomez-Isla y col., 2008).

En cuanto al papel fisiológico del A β , hasta hace relativamente poco tiempo apenas se disponía de información. Trabajos recientes sugieren que este péptido podría tener un papel crucial en el mantenimiento de la tasa basal y en la regulación de la liberación de vesículas desde terminales presinápticos excitatorios (Abramov y col., 2009). Además, se le atribuye un papel como regulador negativo a niveles postsinápticos cuando se encuentra

a altas concentraciones (ver revisión Palop y Mucke, 2010). De hecho, se ha descrito que concentraciones picomolares de A β mejoran la plasticidad sináptica y la memoria (Puzzo y col., 2008; Morley y col., 2010). Por otro lado, los monómeros de A β 42 parecen ejercer un papel neuroprotector (Giuffrida y col., 2009). Todos estos datos apuntan a la pérdida de función del A β como otra causa de la patología de la EA.

1.1.3.4.1. Tipos de depósitos extracelulares de β -amiloide

Las placas amiloides o seniles son agregados proteicos extracelulares formados por el péptido A β y se dividen en (ver revisiones Selkoe, 2001; Perl, 2010):

- Placas neuríticas: depósitos extracelulares de aspecto filamentoso (Dickson, 1997). Asociadas a estas placas aparecen neuritas distróficas (inmunopositivas para Tau, APP, Ubiquitina o ChAT) y células de la microglía, mientras que la astrogliá se localiza en la periferia (Duyckaerts y col., 2009; Fig. 1.10). Se subdividen en placas primitivas (esféricas y sin núcleo compacto, que aparecen en zonas cercanas a los axones y las sinapsis) y placas clásicas (núcleo amiloide denso, redondo y compacto y un halo alrededor, que se asocian especialmente a los vasos).
- Placas difusas: son depósitos extracelulares no fibrilares (no congofilicos). Son zonas difusas o amorfas sin núcleo compacto, con poca o ninguna microglía y no suelen poseer neuritas distróficas ni astrogliá (Selkoe, 2001).

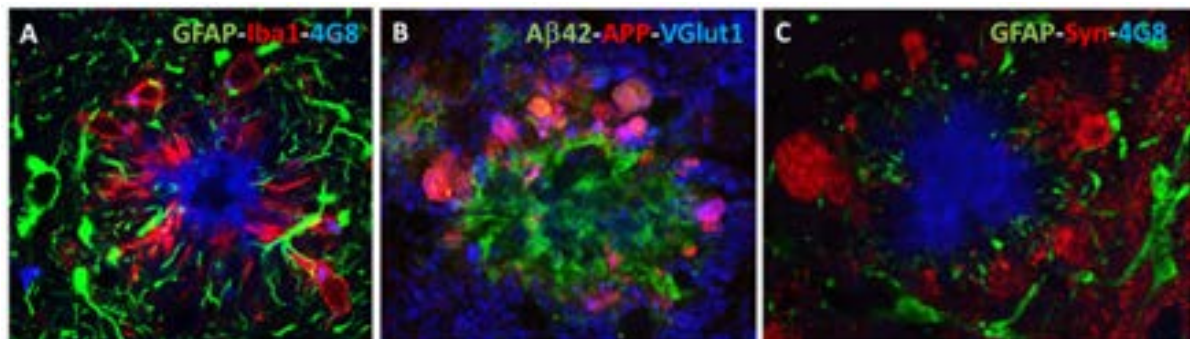


Figura 1.10. Placas neuríticas de un ratón transgénico de la EA. A) Triple inmunohistoquímica para GFAP (astroglía), Iba1 (microglía) y 4G8 (placas de A β), donde se observa la disposición de la micro- y astrogliá alrededor de las placas, la primera en contacto íntimo y la segunda en la periferia. B) Triple inmunohistoquímica para A β 42 (amiloide), APP (marcador de distrofias) y VGlut1 (transportador vesicular de glutamato). Alrededor de las placas amiloides neuríticas aparecen neuritas distróficas (en este caso positivas para APP y VGlut1). C) Triple inmunohistoquímica para GFAP (astroglía), Syn (Sinaptofisina) y 4G8 (placa), que muestra la relación entre las placas (azul), neuritas distróficas (rojo) y la astrogliá (verde). (Imágenes originales del grupo).

En las placas seniles además de A β , se acumulan otras moléculas como APOE, APOJ, α 2-macroglobulina, IL-1 α , IL-6, componentes del sistema del complemento, zinc, cobre, hierro, componentes de la matriz extracelular (como ICAM1, trombospondina, heparán sulfato), catepsina D, etc. (ver revisión Thal y col., 2006; Duyckaerts y col., 2009).

1.1.3.4.2. Formas oligoméricas del β -amiloide

Hasta hace una década, la EA se caracterizaba por la formación de fibras insolubles de A β que se depositaban extracelularmente, formando las placas seniles, motivo por el cual se generó la hipótesis de la cascada amiloide (ver Apdo. 1.1.7.1). Sin embargo, hoy en día se piensa que estas placas no son el principal agente causal de los problemas sinápticos o la pérdida neuronal, ya que no siempre el número de placas amiloides correlaciona con la severidad de la patología (Mucke y col., 2000). Se ha descrito la existencia de formas tóxicas solubles⁶ de A β oligomérico capaces de generar estos daños, al difundir por el parénquima cerebral provocando pérdida sináptica y fallos cognitivos en las fases tempranas de la EA (Haass y Selkoe, 2007; Benilova y col., 2012; Viola y Klein, 2015).

En cuanto al proceso de oligomerización-fibrilización, existen distintos estudios que sugieren que las proteínas amiloides se agregan formando distintos intermediarios (ver revisión Sakono y Zako, 2010) de entre 8 (dímeros) y 100 kDa (Shankar y col., 2008). Brevemente, en primer lugar, la asociación de pequeños n-oligómeros solubles (LMW-A β , del inglés *Low Molecular Weight*), resultaría en ensamblajes de peso molecular más alto, incluyéndose en este grupo a las estructuras anulares, paranúcleos, ligandos difusibles derivados del A β (ADDLs, del inglés *A β -derived diffusible ligands*, cuyos niveles correlacionan bien con los fallos cognitivos y pueden inhibir la LTP en el hipocampo) (Lambert y col., 1998; Haass y Selkoe, 2007), A β *56 (Lesné y col., 2006), amiloesferoides (Noguchi y col., 2009), y las protofibrillas (PFs; Walsh y col., 1997). Éstas excederían los límites de solubilidad y se depositarían como fibrillas amiloides en conformación de hoja β plegada (ver revisión Goldsbury y col., 2005). Los mecanismos por los cuales se producen estos ensamblajes no están claramente definidos.

1.1.3.4.3. Acumulación intracelular de β -amiloide

En principio, el A β fue identificado formando parte de las placas extracelulares y fue en los años 80 cuando se identificó su existencia en el interior celular (A β i). El A β i está presente, frecuentemente, en neuronas que contienen ovillos neurofibrilares, por lo que ambas patologías podrían estar ligadas (Blurton-Jones y LaFerla, 2006). La acumulación de A β i puede ser un acontecimiento temprano en la EA (Bayer y Wirths, 2010), ya que aparece en las células piramidales del hipocampo y la corteza entorrinal (regiones con afecciones patológicas más evidentes) de pacientes con defectos cognitivos leves y los niveles parecen descender con la formación de las placas. Esta acumulación intracelular se da, incluso, en individuos sanos (ver revisión LaFerla y col., 2007).

El A β puede acumularse de forma intracelular por dos motivos. El primero, que una vez sintetizado no sea secretado (la proteína APP puede estar en el Golgi, RE, etc., por lo

⁶ El término “soluble” hace referencia a cualquier forma de A β que es soluble en un tampón acuoso y que permanece en solución después de centrifugar a alta velocidad.

que el A β podría generarse en estos compartimentos y quedarse en el interior celular). El otro sería que, tras ser secretado al exterior, el A β sea reinternalizado a través de diferentes transportadores específicos, como la subunidad $\alpha 7$ del receptor nicotínico ($\alpha 7nAChR$; Wang y col., 2000), el receptor LDLR de APOE (Zerbinatti y col., 2006) o los receptores NMDA (Bi y col., 2002). Los endosomas son un sitio probable de generación de A β , ya que la enzima BACE-1 necesita un pH ácido para su actividad óptima, por lo que la proteína APP podría ser internalizada por endocitosis desde el exterior, y sufrir proteólisis en el interior endosomal; de hecho, el bloqueo de la internalización de APP hace que se reduzcan los niveles de A β (ver revisión LaFerla y col., 2007).

El A β _i se acumula predominantemente en los cuerpos multivesiculares de las neuronas, donde se asocia con la patología sináptica (Takahashi y col., 2002). Estos cuerpos se pueden fusionar con la membrana plasmática liberando el A β al espacio extracelular como exosomas cuyo papel es desconocido pero que podrían funcionar como semillas de nucleación para la formación de las placas o como medio de propagación del amiloide a través del cerebro (Rajendran y Annaert, 2012). El A β _i puede afectar a la función mitocondrial y del proteasoma, provocar una disfunción sináptica y facilitar la hiperfosforilación de Tau (LaFerla y col., 2007), provocar un déficit en la LTP (Billings y col., 2005) y la muerte neuronal (Li y col., 2009b; ver revisión Bayer y Wirths, 2010) (Fig. 1.11)⁷.

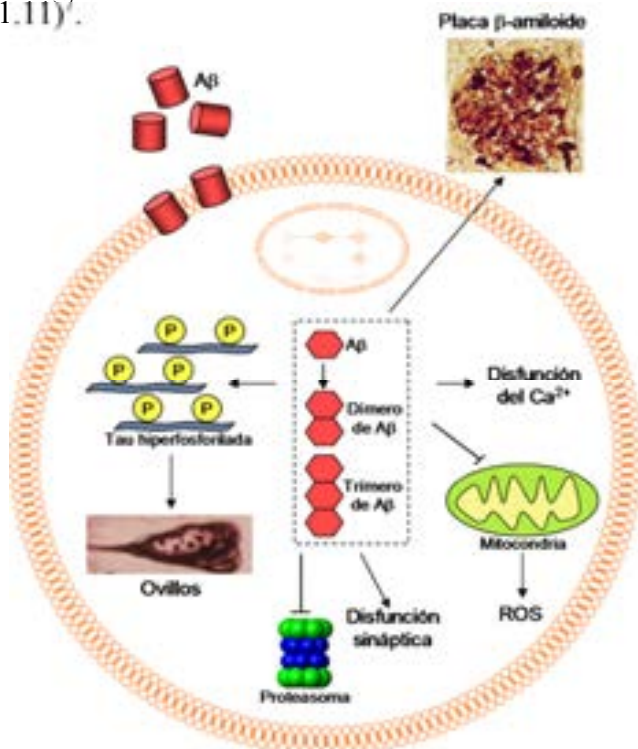


Figura 1.11. Efectos patológicos del A β intraneuronal. El A β , producido intracelularmente o tomado desde fuentes extracelulares, tiene varios efectos patológicos en la función de la célula y sus orgánulos. El A β puede presentarse en forma monomérica que se puede agregar en oligómeros y éstos pueden mediar los eventos patológicos observados *in vivo*. El A β _i puede contribuir a la patología de la EA al facilitar la hiperfosforilación de Tau, alterar la función mitocondrial y del proteasoma, la homeostasis del calcio y provocar la disfunción sináptica. ROS: especies reactivas de oxígeno (Modificado de LaFerla y col., 2007).

⁷ En modelos de la EA, el A β _i se observó por primera vez en ratones PS1 que mostraban neurodegeneración sin formación de placas. Posteriormente, se ha demostrado acumulación intracelular en otros modelos, en algunos de los cuales se ha correlacionado con la pérdida neuronal: PS1_{M146L}APP_{SDL}, APP_{SL}PS1_{M156L}, Tg2576, 3xTg-AD, 5xFAD, APP_{Arc}, etc. (ver revisión Bayer y Wirths, 2010).

1.1.3.4.4. Degradación del β -amiloide

La acumulación de $A\beta$ tiene lugar por un desbalance entre su producción y eliminación (ver revisiones Evin y Weidemann, 2002; Thal y col., 2006; Duyckaerts y col., 2009). El incremento en la secreción de $A\beta$ ocurre en pacientes con EA familiar con mutaciones en los genes *APP*, *PS1* o *PS2*. Los casos de Alzheimer esporádico, sin embargo, no muestran signos de un incremento en su producción, y se ha sugerido que una disminución de su degradación y una reducción en el drenaje perivascular pueden explicar el incremento en la cantidad de $A\beta$ de estos pacientes (Miners y col., 2014).

Para la degradación del $A\beta$ existen distintos tipos de proteasas que degradan las distintas formas del péptido (De Strooper, 2010). La **neprelisina** es una zinc-metaloproteasa capaz de hidrolizar péptidos circulantes, que se encuentra anclada a la membrana plasmática y es capaz de eliminar el $A\beta$ insoluble asociado a ésta. Los niveles de neprelisina disminuyen con el envejecimiento (Farris y col., 2007), provocando un aumento de $A\beta$. La enzima degradadora de insulina (**IDE**) es una tiol metaloproteasa que reconoce sustratos con estructura en hoja β -plegada. Aparece como una proteína soluble citosólica, aunque también puede encontrarse asociada a membrana. Es capaz de degradar el $A\beta$ en su estado monomérico, pero no cuando éste se agrega y forma fibrillas insolubles. También participan en la degradación del $A\beta$ las **enzimas convertidoras de endotelina** (ECE1 y ECE2) y las **metaloproteasas de matriz** (MMPs; Yan y col., 2006).

El $A\beta$ puede ser degradado, además, intracelularmente vía **autofagia** (Nixon, 2007; Mizushima y Komatsu, 2011; Nixon y Yang, 2011; Friedman y col., 2015) o **vía lisosomal**. Así, se ha descrito que la enzima lisosomal catepsina B degrada $A\beta$ (Mueller-Steiner y col., 2006). Por último, se ha implicado a las **células gliales** en la eliminación de $A\beta$ del parénquima mediante fagocitosis (Lee y Landreth, 2010) y la secreción de enzimas proteolíticas como neprelisina e IDE. Por este motivo se están encaminando esfuerzos hacia la generación de terapias de inmunización que potencien el proceso fagocítico (Sokolowski y Mandell, 2011).

1.1.4. Ovillos neurofibrilares intracelulares y la proteína Tau

La proteína Tau es un péptido cuya función es estabilizar los microtúbulos (MTs) del citoesqueleto y favorecer su polimerización (ver revisión Scholz y Mandelkow, 2014), por lo que es crítica para la supervivencia celular, ayudando a mantener la estructura interna de la célula. Esta proteína se encuentra codificada por el gen *MAPT* (cromosoma 17) (Neve y col., 1986). En el cerebro adulto humano se producen 6 isoformas mediante procesamiento alternativo⁸ (ver revisiones Duyckaerts y col., 2009; Wang y col., 2013).

⁸ Las isoformas que se generan se diferencian por las 3 (3R-Tau) o 4 (4R-Tau) repeticiones del motivo de unión a tubulina en el extremo C-terminal, siendo la isoforma 4R-Tau la de mayor afinidad por los microtúbulos.

Cuando se produce una hiperfosforilación anómala de Tau (Fig. 1.12), los MTs se desorganizan y la proteína Tau, al ser insoluble, tiende a agregarse formando filamentos apareados helicoidales (PHF), pasando de la zona axonal a la somatodendrítica, donde estos filamentos se unen formando los ovillos neurofibrilares intracelulares (NFTs)⁹, característicos de la EA (Morishima-Kawashima e Ihara, 2002). Al despolimerizarse los MTs se originan fallos en el transporte axonal y en todos los procesos que dependen de él. Además, una extensa fosforilación de Tau inhibe la actividad del proteasoma (Gendron y Petrucelli, 2009; Wang y col., 2013). La acumulación de Tau se presenta de tres formas: en el cuerpo celular de las neuronas como NFTs, en las dendritas como *neuropil threads*, y en los axones formando la corona neurítica de las placas seniles. La hiperfosforilación de Tau se da en las neuronas con degeneración neurofibrilar y en las neuritas distróficas alrededor de los depósitos amiloides, dando lugar a placas neuríticas (Duyckaerts y col., 2009).

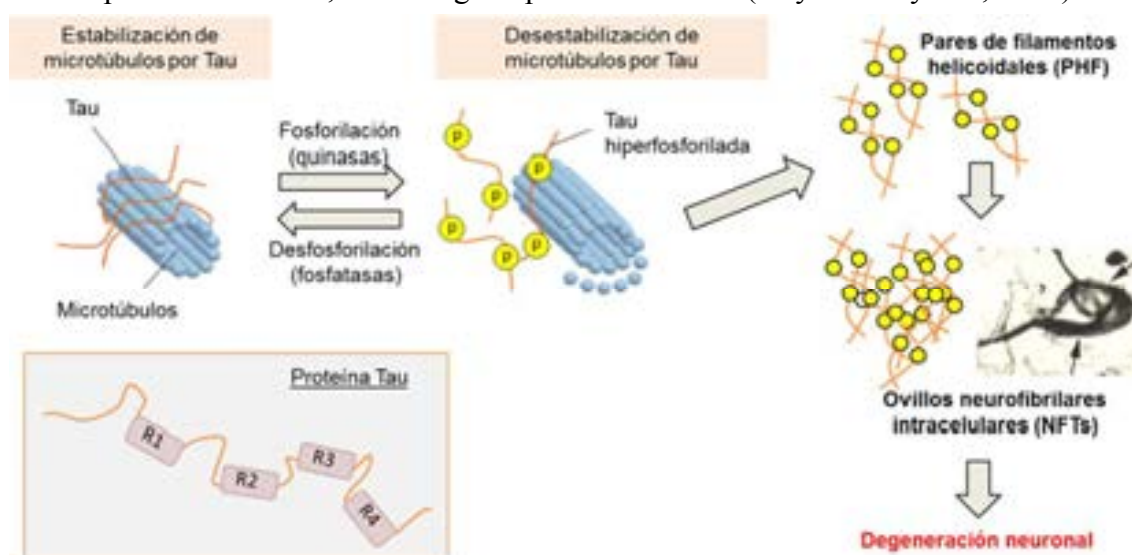


Figura 1.12. Formación de ovillos neurofibrilares. Tau es una proteína estabilizadora de microtúbulos que al ser fosforilada, provoca una desestabilización de éstos. La proteína Tau hiperfosforilada se agrega formando pares de filamentos helicoidales que, finalmente, originan los NFTs, implicados en la degeneración neuronal. En el recuadro de la izquierda se muestra la estructura de la proteína Tau con 4 repeticiones del motivo de unión a tubulina (4R-Tau). (Modificado de Querfurth y LaFerla, 2010).

El estado de fosforilación de una proteína depende de la actividad de las enzimas quinasas y fosfatasa que actúan sobre ella. Se conocen más de 20 quinasas diferentes implicadas en la fosforilación de Tau, de las cuales las más conocidas son la proteína quinasa dependiente de ciclina (CDK-5) y la quinasa glucógeno sintasa 3 (GSK-3) (Kimura y col., 2014) y las proteínas fosfatasa PP-1 y PP-2A. Estas enzimas se han considerado como dianas terapéuticas para atenuar la hiperfosforilación de Tau (ver Adpo. 1.3.2). La existencia de grandes cantidades de A β o estrés oxidativo en las células, puede

⁹ Debido a la presencia de NFTs intracelulares, formados por la proteína Tau hiperfosforilada, la EA es una taupatía (Lee y col., 2001), término que agrupa a distintas enfermedades con depósito anormal de Tau hiperfosforilada en neuronas y células gliales. Existen unas 40 mutaciones de Tau ligadas a la demencia frontotemporal, mientras que ninguna ha sido descrita en familias con EA.

provocar una desregulación en la actividad de las quinasas de Tau, provocando su hiperfosforilación y la generación de NFTs. Además, se ha propuesto que el metabolismo de APP regula la proteostasis de Tau (Moore y col., 2015). Asimismo, Tau puede sufrir otras modificaciones postraduccionales, como glicosilación, acetilación, ubiquitinación, etc., que afectan a su agregación (Iqbal y Grundke-Iqbal, 2008; Wang y col., 2013).

Datos recientes han sugerido que las formas solubles de A β y Tau pueden jugar un papel más importante que las placas y ovillos en el daño sináptico y la demencia (McDonald y col., 2012). De hecho, aunque se había propuesto que el número total de ovillos predice la pérdida neuronal en la EA, ésta última supera a la formación de ovillos (Gomez-Isla y col., 1997) y estudios recientes indican que es la acumulación anormal de especies solubles de Tau en la sinapsis la que pueda estar más relacionada directamente con la muerte neuronal (Perez-Nievas y col., 2013; Spires-Jones y Hyman, 2014).

1.1.5. Pérdida neuronal y sináptica

La EA es una enfermedad caracterizada por una extensa y selectiva degeneración neuronal que afecta a regiones y tipos celulares concretos (Duyckaerts y col., 2009), como el área CA1 del hipocampo y la capa II de la corteza entorrinal (CE) (Gomez-Isla y col., 1996; Kordower y col., 2001; Price y col., 2001), el bulbo olfatorio y el núcleo olfatorio anterior (Ter Laak y col., 1994), la amígdala (Vereecken y col., 1994), el núcleo basal de Meynert (Vogels y col., 1990), la parte medial de la sustancia negra, la parte rostral del *locus coeruleus* (Busch y col., 1997) y el núcleo del rafe (Aletrino y col., 1992).

Los tipos celulares afectados por la patología incluyen el sistema colinérgico de los ganglios basales. En personas de edad avanzada y en pacientes con demencia existen disfunciones colinérgicas importantes en el sistema nervioso central (SNC), relacionadas con la pérdida de memoria (Bartus y col., 1982). El sistema GABAérgico y glutamatérgico también se encuentran afectados. En los casos preclínicos de EA, en los que no existe demencia aunque ya aparecen las primeras placas y NFTs, las neuronas colinérgicas del telencéfalo basal (Whitehouse y col., 1981) y las noradrenérgicas del *locus coeruleus* (German y col., 1992) son las más afectadas, mientras que la región CA1 del hipocampo y la CE no muestran una disminución neuronal (Giannakopoulos y col., 1998). Sin embargo, en las fases tardías de la enfermedad, se produce una pérdida masiva de neuronas hipocampales y corticales (Price y col., 2001). El declive cognitivo se correlaciona estrechamente con la pérdida neuronal. Las causas y los mecanismos de muerte neuronal se desconocen, aunque poseen un papel importante la generación de especies reactivas de oxígeno, la sobreactivación de receptores de aminoácidos excitadores como el glutamato y el incremento en la concentración citoplasmática de calcio.

Los modelos animales transgénicos de la EA recapitulan algunas de las lesiones histopatológicas observadas en los pacientes, pero no todas (ver Apdo. 1.2). Es de destacar, que la mayoría de estos modelos presentan escasa muerte neuronal, siendo esta

característica su principal limitación. No obstante, se ha descrito pérdida neuronal selectiva en el hipocampo (Casas y col., 2004; Schmitz y col., 2004; Ramos y col., 2006; Jimenez y col. 2008), la neocorteza (Christensen y col., 2008), la corteza entorrinal (Lazarov y col., 2006; Moreno-Gonzalez y col., 2009) y otras regiones cerebrales (Ribe y col., 2005; Lee y col., 2006; Devi y Ohno, 2010; Perez y col., 2011).

La EA también se caracteriza por una pérdida muy acusada de las conexiones sinápticas, lo que genera los fallos en las funciones cognitivas y la memoria característicos. Numerosos estudios histológicos y bioquímicos realizados en muestras *post mortem* de pacientes han demostrado una disminución en las sinapsis y en sus proteínas asociadas, en la corteza y el hipocampo (Terry col., 1991; Scheff y Price, 2003; Scheff y col., 2007). Por ejemplo, se ha determinado un 30% de pérdida en la densidad sináptica (Davies y col., 1987) y la disminución de inmunorreactividad para sinaptofisina en hipocampo y corteza de personas que presentaban deterioro cognitivo leve o EA leve (Overk y Masliah, 2014). Estos datos indican que anterior a la muerte neuronal, existen fallos/alteraciones a nivel sináptico, y son éstas las que mejor correlacionan con las deficiencias cognitivas en los pacientes (Tampellini y Gouras, 2010). La acumulación de A β está asociada con la pérdida de la función sináptica y espinas dendríticas y con la formación de neuritas distróficas, actuando sobre los procesos de memoria y aprendizaje (Small, 2008). Lauren y col., (2009) han revelado una base molecular para la función antisináptica del A β , al identificar un receptor específico para el A β ₄₂ oligomérico que media la supresión de la LTP, incrementa la depresión a largo plazo (LTD) y reduce la densidad de espinas dendríticas.

1.1.6. Neuroinflamación

La reacción inflamatoria que caracteriza a la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas implica la activación de componentes de la respuesta inmune innata (microglía y astrogía; Heneka y col., 2015a). La respuesta inmune adaptativa y la infiltración de linfocitos T se da en menor grado en la EA. Mientras que la respuesta inflamatoria es necesaria y crucial si el agente desencadenante es un patógeno o una célula dañada, la respuesta inflamatoria aberrante o crónica causa graves daños tisulares. Así, el proceso neuroinflamatorio puede sobreactivarse, lo que resulta en un daño celular y la pérdida de la función neuronal en la EA (Heneka y O'Banion, 2007; Perry y col., 2010; Heneka y col., 2015b; Heppner y col., 2015), al igual que en otras enfermedades neurodegenerativas, como el Parkinson (Mena y García de Yebenes, 2008).

El proceso inflamatorio se produce tras el depósito extracelular del A β y se caracteriza por una activación de la microglía y la aparición de astrocitos reactivos, que pueden generar productos tóxicos que provoquen la muerte neuronal, tales como citoquinas inflamatorias, aminoácidos excitadores y ROS (Mrak y Griffin, 2005). Debido a que es el A β el que inicia el proceso inflamatorio, son las zonas en las que más A β se deposita,

como el hipocampo, el subículo y la corteza entorrinal, las que muestran mayor activación microglial. Además, este proceso se ha asociado con la formación de placas de A β y ovillos neurofibrilares, ya que un ambiente inflamatorio puede activar las quinasas de Tau (ver revisión McNaull y col., 2010). Aún se desconoce si la neuroinflamación es una consecuencia secundaria al proceso de neurodegeneración en la EA o es una de las causas que provocan su aparición y desarrollo (Wyss-Coray, 2006; Glass y col., 2010).

1.1.6.1. Microglía

El SNC es un órgano inmunológicamente privilegiado, ya que tiene un sistema inmune endógeno liderado por células inmunocompetentes propias: la microglía. Ésta se presenta en el cerebro como un agente protector con diferentes funciones: proliferación, motilidad y migración, comunicación intercelular, fagocitosis y proteostasis. El efecto del envejecimiento sobre la microglía no conlleva necesariamente la pérdida de estas funciones, sino que implica una disfunción de las mismas y una respuesta hiperreactiva (Gomez-Nicola y Perry, 2015). De hecho, se ha observado que la microglía muestra cambios morfológicos y moleculares con el envejecimiento y progresión de la EA, una mayor capacidad proliferativa y la presencia de microglía “distrófica”, caracterizada por la fragmentación, pérdida de prolongaciones, etc. (Baron y col., 2014; Mosher y Wyss-Coray, 2014; Streit y col., 2014), algo que también se ha observado en modelos de la EA. La implicación de microglía en la EA se encuentra apoyada por estudios que muestran que variantes genéticas en moléculas relacionadas con la microglía, como *TREM2* (Guerreiro y col., 2013), están asociadas con un incremento en el riesgo de Alzheimer esporádico.

Clásicamente, la microglía se diferencia en microglía en reposo (residente o quiescente), y en microglía reactiva o activada, con características funcionales similares a los macrófagos sanguíneos. La microglía, al igual que los macrófagos periféricos, se activa dando lugar a diversos fenotipos funcionales, que pueden tener propiedades neurotóxicas o neuroprotectoras según la señal de activación que reciban (ver revisión Varnum e Ikezu, 2012; Cherry y col., 2014; Latta y col., 2014; Tang y Le, 2015; Fig. 1.13):

- Activación clásica: Los macrófagos activados clásicamente o M1 son inducidos por IFN- γ , TNF- α y/o ligando de receptores TLR (*toll like receptor*), como pueden ser los lipopolisacáridos (LPS; endotoxinas de la membrana externa de bacterias Gram negativas). Muestran un fenotipo Th1 (proinflamatorio) y producen IFN- γ , IL-2, IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, TNF- α , ROS y óxido nítrico (NO). Poseen una mayor expresión de MHCII y CD86 e intervienen en la presentación antigénica asociada a las células Th1. Los macrófagos M1 tienen una gran actividad antimicrobiana y constituyen un importante mecanismo de defensa. La activación clásica también causa la liberación de enzimas proteolíticas que puedan conducir al deterioro de la matriz extracelular, degradando la integridad celular.

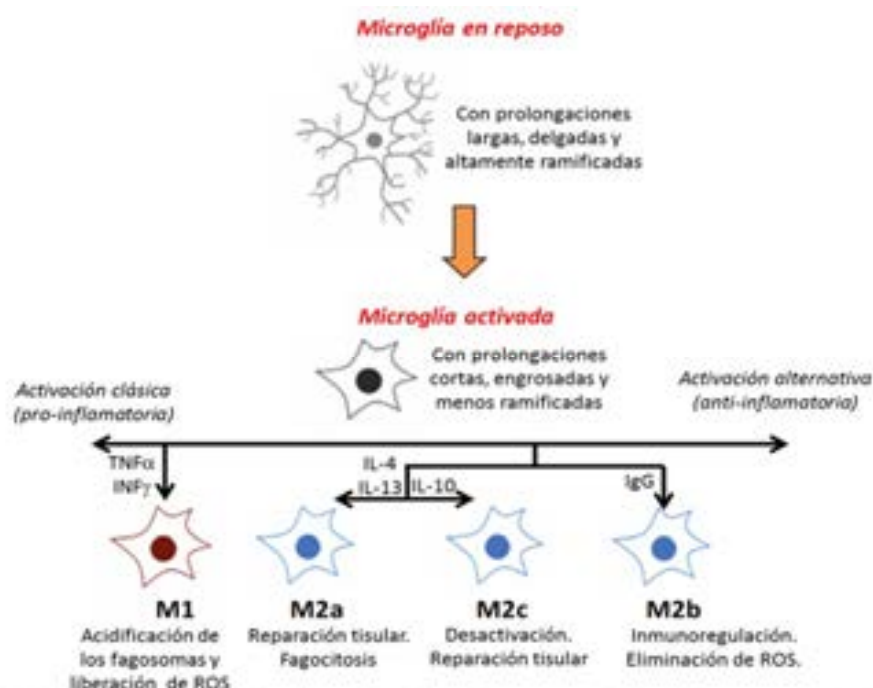


Figura 1.13. Clasificación de la activación microglial. Se muestran los distintos estadios de activación microglial, así como la función de cada uno de ellos. Los macrófagos M2 son más heterogéneos que los M1 y se subdividen en M2a, M2b y M2c. El tipo M2a es activado por IL-4/IL-13 y conduce a una respuesta inmune Th2 clásica. Se encargan de la resolución de la inflamación y la fagocitosis. Los M2b son activados por complejos inmunes (IgG-antígeno) y por TLR/IL-1R, y representan un estadio intermedio entre el M1 y el M2a. Estos macrófagos eliminan especies reactivas de oxígeno y nitrógeno liberadas durante la activación M1. Por último, los M2c se activan por IL-10 y tienen una función inmunosupresora, siendo importantes en la remodelación tisular (Modificado de Latta y col., 2014).

- **Activación alternativa:** Los macrófagos activados alternativamente (M2) muestran un fenotipo Th2 (antiinflamatorio) y están involucrados en la resolución de la inflamación y reparación del tejido, inhibiendo la producción de IFN- γ . Los macrófagos M2 producen IL-4, IL-5, IL-10 y TGF- β y se diferencian de los M1 por la presencia de marcadores de superficie como el receptor de manosa (CD206) y Arginasa-1. Otros marcadores como Ym1/Ym2, AMCcase y FIZZ1, son también característicos del estadio M2 pero son expresados también por otras células. Los macrófagos M2 se dividen en M2a (caracterizados por la presencia del receptor IL-1Ra y de Arginasa), M2b (cuyo marcador específico es CD86) y M2c (que parece tener actividad reguladora y antiinflamatoria).

Todavía no se conoce el papel de la microglía en la EA. Por un lado, el A β puede atraer y activar la microglía (Malm y col., 2005; Meyer-Luehmann y col., 2008), provocando que las placas se encuentren envueltas por sus prolongaciones, constituyendo así la microglía una barrera física frente a la toxicidad de la placa al evitar su expansión. De hecho, las áreas de las placas no cubiertas por la microglía son menos compactas y están asociadas con una distrofia axonal más severa (Condello y col., 2015). Además de esta barrera celular física, la fagocitosis activa de A β oligomérico por la microglía

(Frautschy y col., 1992; Mandrekar y col., 2009) y la actividad proteolítica de las enzimas secretadas por ésta (Yang y col., 2011), podrían reducir la polimerización del A β impidiendo que la placa aumentase de tamaño (Simard y col., 2006; Bolmont y col., 2008). A favor de esto, está el hecho de que la microglía expresa receptores que reconocen A β (Yu y Ye, 2015) y enzimas que lo degradan (como neprelisina). No obstante, todavía no está claro si la microglía tiene la capacidad de degradar intracelularmente el A β internalizado o si esta capacidad se encuentra disminuida con el envejecimiento y progresión de la enfermedad. La microglía está, además, involucrada en la EA debido a un papel del receptor de quimocinas microgliales CX3CR1 en la pérdida neuronal, ya que un ratón *knockout* para éste, no muestra muerte neuronal y presenta una menor carga amiloide (Fuhrmann y col., 2010; Liu y col., 2010; Cho y col., 2011). La delección del gen *CX3CR1* o la inmunoterapia anti-A β provocan la expansión de la cobertura microglial y una reducción en las neuritas distróficas, sugiriendo un papel neuroprotector para la microglía. Por lo tanto, se propone la barrera microglial como una nueva diana terapéutica para la EA (Condello y col., 2015). Es posible que el descenso en la complejidad de las prolongaciones microgliales asociadas con las placas de A β sea un factor importante en el acelerado declive cognitivo observado en modelos de la EA (Baron y col., 2014). Así, la microglía parece intervenir en el mantenimiento de la integridad de la red neuronal (Kettenmann y col., 2013). De hecho, un estudio reciente ha mostrado que la disminución microglial en ratones ocasiona un déficit cognitivo y una reducción en la actividad motora dependiente de formación de sinapsis dentro de la corteza motora (Parkhurst y col., 2013).

Por otro lado, la microglía podría causar neurotoxicidad debido a su capacidad de secretar citoquinas y especies reactivas de oxígeno (McGeer y McGeer, 2010). Aunque la microglía activada pueda generar mediadores proinflamatorios, también es capaz de secretar citoquinas antiinflamatorias (Butovsky y col., 2006) y factores neuroprotectores (Streit, 2005). El posible papel neuroprotector de la inflamación en la EA está cobrando fuerza actualmente y, en apoyo a esta idea, está el estudio en el que la ausencia de microglía en un modelo animal provoca un incremento en la formación de placas y la muerte neuronal (El Khoury y col., 2007). En humanos y en animales transgénicos se ha observado la existencia de distintos tipos de activación microglial, pudiendo ocurrir un cambio durante la progresión de la enfermedad (Colton y col., 2006; Jiménez y col., 2008). Queda por dilucidar si la función microglial juega un papel beneficioso o perjudicial, pudiendo ser diana de propuestas terapéuticas.

1.1.6.2. Astrogliá

Los astrocitos son células gliales del SNC que se caracterizan por la expresión de la proteína glial fibrilar ácida (GFAP). En tejido *post mortem* de la EA y en el de ratones transgénicos se observa una reactividad astrocitaria generalizada (ver revisión Verkhratsky y col., 2010; Fu y Jhamandas, 2014). Los astrocitos reactivos se concentran en las regiones

de placas de A β , secretando moléculas proinflamatorias al ser activados por éstas, generando daños celulares (Johnstone y col., 1999; Tuppo y Arias, 2005). Además, los astrocitos son capaces de producir NO (Simic y col., 2000) y expresan receptores para citoquinas inflamatorias como IL-1 β y TNF- α (ver revisión Morales y col., 2014).

Por otro lado, los astrocitos también poseen capacidad neuroprotectora, siendo capaces de eliminar glutamato del espacio extracelular, previniendo daños por excitabilidad neuronal. Además, protegen a las neuronas del daño oxidativo, ya que poseen una alta actividad de la enzima superóxido dismutasa (Pertusa y col., 2007). Asimismo, la acumulación alrededor de las placas permite la fagocitosis del péptido A β habiéndose observado éste en el interior de estas células (Nagele y col., 2003), sugiriendo su implicación en la síntesis o fagocitosis de A β , siendo más probable esta última, ya que se ha determinado su capacidad fagocítica *in vitro* e *in vivo* (Wyss-Coray y col., 2003). Esta capacidad fagocítica permite el aclaramiento de las placas amiloides. Por otra parte, recientemente se ha sugerido que los astrocitos pueden desempeñar un papel relevante en el denominado “sistema glinfático” (Nedergaard, 2013), encargado de generar flujos de líquido intersticial, proveniente del espacio perivascular, desde las ramas arteriales hasta las ramas venosas. Este flujo “glinfático” estaría encargado de drenar el exceso de proteínas extracelulares, como el A β evitando su acumulación. La delección de GFAP y vimentina en el modelo APP/PS1 de la EA, provoca una exacerbación de la carga amiloide, que es independiente del procesamiento de APP y de la producción de A β (Kraft y col., 2013), lo que sugiere que los astrocitos son importantes en la eliminación del A β .

A día de hoy el potencial patológico o neuroprotector de los astrocitos en la progresión de la EA no es bien conocido, siendo fundamental caracterizar a nivel funcional la astroglia reactiva.

1.1.6.3. Citoquinas y radicales libres

Las citoquinas son moléculas de comunicación intercelular capaces de regular funciones celulares como la proliferación, diferenciación, producción de otras moléculas y, sobre todo, el proceso inflamatorio. Son producidas, principalmente, por linfocitos y macrófagos en su estado activado¹⁰ y aparecen en niveles elevados en el cerebro de pacientes de la EA, tanto las de la naturaleza pro- como antiinflamatoria, entre ellas las interleuquinas (IL-1, IL-4, IL-6, IL-10), TNF- α y TGF- β (Heneka y O’Banion, 2007).

Los radicales libres intervienen en la respuesta inflamatoria que se da en la EA, ya que el A β puede activar directamente el complejo NADPH oxidasa (Mosher y Wyss-Coray, 2014). Entre ellos se encuentran las ROS, que pueden generar estrés oxidativo, y

¹⁰ Según las células que las produzcan se denominan monoquinas (monocitos o macrófagos), interleuquinas (leucocitos en general) o linfoquinas (linfocitos). Las quimioquinas son un pequeño grupo de citoquinas proinflamatorias que participan en el reclutamiento de células inflamatorias.

especies nitrogenadas, como el NO (Heneka y O'Banion, 2007). Los radicales libres pueden ser producidos por neuronas afectadas y por la microglía y astroglia activadas.

1.1.7. Hipótesis de la Enfermedad de Alzheimer

Se han propuesto diversas hipótesis explicativas para el desarrollo de la EA (ver revisión de la Torre, 2011). Aquí, se van a exponer las principales.

1.1.7.1. Hipótesis de la cascada amiloide

Esta teoría (Hardy y Higgins, 1992) establece que la acumulación de A β es el evento inicial de la EA (Fig. 1.14). Cambios en el metabolismo del A β conllevan un incremento en sus niveles, principalmente de la forma A β_{42} que tiende a oligomerizar provocando disfunción sináptica y la formación de neuritas distróficas. La deposición del A β formando placas provoca la activación glial alrededor de éstas. Con el tiempo se genera estrés oxidativo (Galea y col., 2012) afectando a la homeostasis neuronal. Estos cambios neuronales provocan daño en el transporte axonal y una alteración de la actividad de fosfatasas y quinasas, con la hiperfosforilación de Tau y la formación de NFTs. La cascada termina con una muerte neuronal masiva y un estado de demencia progresivo.

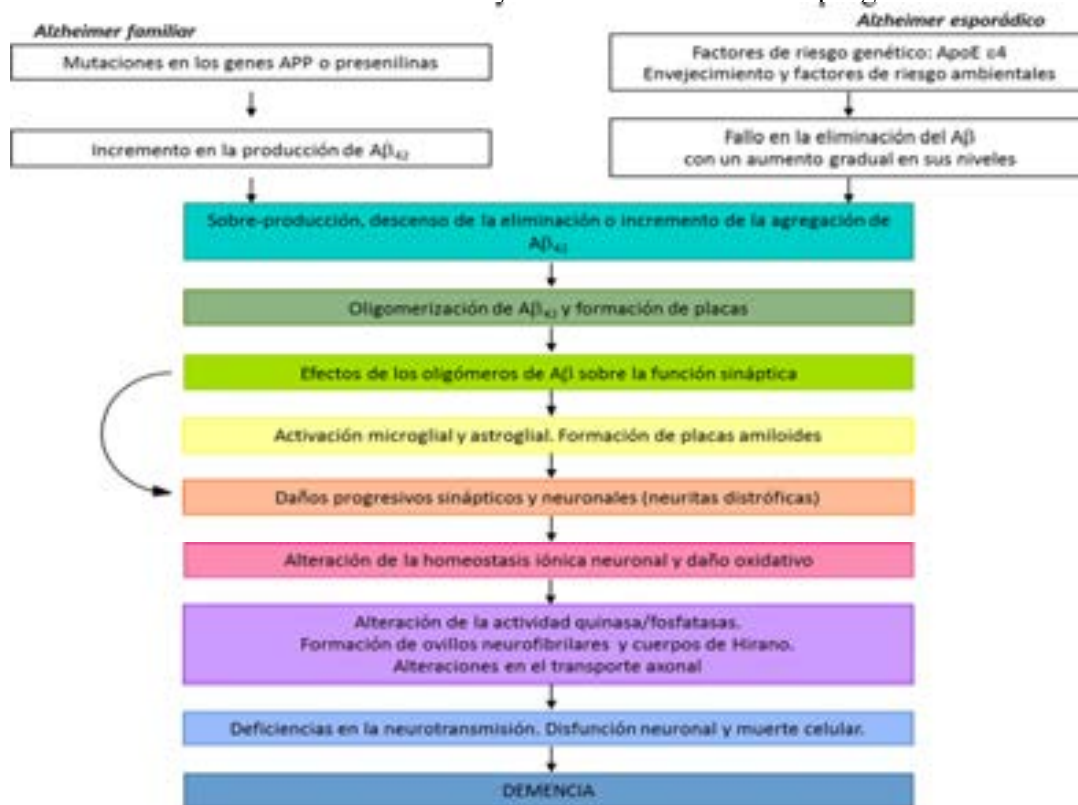


Figura 1.14. Posible sucesión de eventos que conforman la hipótesis de la cascada amiloide. El depósito de A β provoca la formación de NFTs, la muerte celular y la demencia. Los cambios graduales en los niveles de A β cerebral inician la cascada amiloide. Éstos se elevan provocando fallos sinápticos, muerte neuronal, aparición de una respuesta inflamatoria y neuritas distróficas. Se genera estrés oxidativo, cambios iónicos (en la homeostasis del calcio) y fallos en el transporte axonal. Finalmente, existe una amplia disfunción neuronal y sináptica, que conlleva a la aparición de demencia. Se han identificado numerosos mecanismos por los que el péptido A β ejerce su neurotoxicidad (ver Crews y Masliah, 2010). (Modificado de Haass y Selkoe, 2007).

Esta hipótesis se apoya por el hecho de que las mutaciones implicadas en la forma familiar de la EA están localizadas en los genes para las proteínas APP y Presenilina, y la mayoría incrementan la producción de A β ₄₂. Es más, las personas con síndrome de Down (trisomía del par cromosómico 21, donde se localiza el gen *APP*) desarrollan placas a edades tempranas (Rovelet-Lecrux y col., 2006). Sin embargo, existen observaciones que ponen en duda esta teoría (Herrup, 2015), como el hecho de que haya animales transgénicos que sobreexpresan mutaciones en *APP* y no desarrollen la secuencia completa de eventos de la cascada. Además, la aparición de placas y ovillos se produce en momentos y regiones diferentes (Armstrong, 2006). Por último, hay estudios que han mostrado una falta de correlación entre la carga amiloide y el daño cognitivo, y la ausencia de mejora cognitiva en los individuos inmunizados contra A β ₄₂ a pesar de la disminución de la carga amiloide (Karran y col., 2011; Musiek y Holtzman, 2015). Para paliar estas contradicciones se ha propuesto que el mecanismo por el que el A β provoca la neurodegeneración es que las placas fibrilares son entes dinámicos que liberan al medio formas oligoméricas tóxicas. Esto conduciría a la reconciliación entre la hipótesis clásica y la oligomérica (Hardy y Selkoe, 2002; Walsh y Selkoe, 2007). Así, el A β oligomérico (Apdo. 1.1.3.4.2) difunde a través del parénquima cerebral causando toxicidad neuronal.

1.1.7.2. Hipótesis de la neurodegeneración del citoesqueleto neuronal

La proteína Tau hiperfosforilada da lugar a los NFTs (ver Apdo 1.1.4), al mismo tiempo que los microtúbulos se desorganizan originando fallos en el transporte axonal que conducirían a la muerte neuronal con la consiguiente liberación de Tau que, de alguna manera, promovería la agregación del A β (ver revisión Gendron y Petrucelli, 2009).

1.1.7.3. Hipótesis colinérgica

La acetilcolina es uno de los principales neurotransmisores del SNC y periférico y está implicada en el aprendizaje y la memoria. Además, el sistema colinérgico participa en la modulación de la expresión de factores neurotróficos importantes en la supervivencia neuronal (Craig y col., 2011). Esta hipótesis se propuso al observar una disminución de la actividad de la enzima de síntesis de este neurotransmisor en la corteza cerebral e hipocampo de pacientes, que correlacionaba con el daño cognitivo (Coyle y col., 1983), y una degeneración de neuronas colinérgicas en el telencéfalo basal (Whitehouse y col., 1982). A favor de esta hipótesis se ha mostrado que la lesión del *septum* medial produce déficits de comportamiento similares a los daños cognitivos observados en las etapas tempranas de la EA (Bigl y Schliebs, 1998). Esta hipótesis ha conducido al desarrollo de los inhibidores de la acetilcolinesterasa (Bartus, 2000; ver Apdo. 1.3), usados en el tratamiento de la EA. Sin embargo, el fallo de estos fármacos en la cura de la EA ha sido visto como una prueba para refutar esta hipótesis y centrar la investigación en A β y/o Tau.

1.1.7.4. Hipótesis neurovascular

La hipoperfusión cerebral aparece durante el envejecimiento con una disminución del flujo sanguíneo de aproximadamente 0,5% por año, y ésta puede ser crítica para la supervivencia neuronal (Iadecola, 2004). La hipótesis neurovascular considera central el papel de enfermedades cerebrovasculares en el desarrollo de la EA, y se basa en estudios epidemiológicos que ligan los problemas vasculares con ésta (Deschaintre y col., 2009), el solapamiento de los síntomas e histopatología de la demencia vascular y la EA (Kalaria, 2002), y el hecho de que la EA suele aparecer asociada con una extensa angiopatía amiloide cerebral o ACC (deposiciones de A β en los vasos sanguíneos; Jiang y col., 2008).

1.1.7.5. Hipótesis inflamatoria

Propone que la inflamación contribuye a la patogénesis de la EA, ya que en los pacientes se han observado niveles altos de citoquinas proinflamatorias y el incremento de células microgliales activadas alrededor de las placas. Dos estudios muestran una correlación negativa entre la función cognitiva y la microgliosis (Edison y col., 2008; Yokokura y col., 2011) aunque los resultados no son concluyentes (ver revisión Varnum e Ikezu, 2012). Además, esta hipótesis se apoya en el hecho de que pacientes tratados con drogas antiinflamatorias presentan una menor incidencia de la EA (Morales y col., 2014).

1.1.7.6. Otras hipótesis de la EA

Recientemente se han propuesto otras hipótesis explicativas, como la hipótesis calpaína-catepsina (Yamashima, 2013) o la del estrés oxidativo (Padurariu y col., 2013). Sin embargo, las teorías basadas en un único factor propuestas no se adecuan a los síntomas clínicos y neuropatológicos. McDonald (2002) ha propuesto un modelo basado en cofactores que propone que combinaciones diferentes de factores de riesgo de la EA (estrés, disfunción colinérgica, dieta, etc.) interaccionan para producir las variantes de la enfermedad. Una de las fortalezas de este modelo es que puede explicar las diferencias individuales observadas entre los pacientes y la diferente respuesta al tratamiento.

A pesar de todos los enigmas por resolver, en las últimas décadas los estudios científicos han proporcionado un importante avance en la comprensión sobre esta enfermedad. Las herramientas de neuroimagen pueden detectar la atrofia de las diferentes regiones del cerebro y la presencia de placas. Las investigaciones genéticas han identificado diferentes variantes de ADN que hacen que algunas personas posean más riesgo de contraer la EA. Sin embargo, para poder identificar dianas terapéuticas selectivas para el desarrollo de terapias eficaces es necesario conocer los mecanismos que subyacen al proceso neurodegenerativo y la demencia, por lo que es necesario el uso de buenos modelos *in vivo* que recapitulen la patología humana (ver siguiente apartado).

1.2.

Modelos transgénicos de Alzheimer

Actualmente no existe ningún tratamiento eficaz para la EA. Esto es debido, en parte, a que las causas de la enfermedad no son completamente conocidas y a la ausencia de buenos modelos que reproduzcan todos los aspectos de la misma. Estos modelos son herramientas de gran valor para probar *in vivo* los efectos de fármacos potenciales (Yamada y Nabeshima, 2000; Webster y col., 2014). Además, estos modelos permiten investigar la evolución temporal de la enfermedad desde los estadios más iniciales.

Existen multitud de modelos de la enfermedad de Alzheimer: modelos espontáneos como monos viejos (Voytko y Tinkler, 2004), perros (Cummings y col., 1996) o ratones de senescencia acelerada; modelos invertebrados, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* (Alexander y col., 2014), *Drosophila melanogaster* (Crowther y col., 2004), o vertebrados como el pez cebra (Newman y col., 2014); modelos *in vitro*; modelos inducidos químicamente (Kausahl y col., 2013); aunque los más empleados para el estudio de esta enfermedad son los modelos transgénicos (tg) murinos, que portan las mutaciones encontradas en los pacientes de la EA familiar (ver revisiones Duyckaerts y col., 2008, Ashe y Zahs, 2010; Elder y col., 2010b; Bilkei-Gorzo, 2014; Neha y col., 2014; Webster y col., 2014). También, se han generado ratas transgénicas (Flood y col., 2009).

Las mutaciones en el gen *APP* o en una de las presenilinas son suficientes para causar el fenotipo de la EA en el cerebro humano; sin embargo, cuando expresamos en el cerebro de ratón transgenes humanos con esas mutaciones se reproducen algunos, pero no todos los síntomas. Ésto puede deberse a diferencias en la respuesta neuroinflamatoria y en el envejecimiento cerebral (Ashe y Zahs, 2010). Por tanto, aún no se ha conseguido generar un modelo que reúna todos los aspectos patológicos de la enfermedad, aunque existen líneas de ratones tg que reproducen algunas de las lesiones más importantes de la

misma y que se utilizan en ensayos preclínicos (Epis y col., 2010). Cuando la demencia se diagnostica, los pacientes ya muestran cambios histopatológicos severos, por lo que los modelos son de gran utilidad para la búsqueda de biomarcadores de las fases iniciales de la enfermedad.

1.2.1. Modelos transgénicos monogénicos basados en APP

La identificación de mutaciones en APP asociadas al FAD permitió la generación de modelos transgénicos que sobreexpresan la forma mutada y no mutada de esta proteína¹¹. El primer ratón transgénico APP que mostraba una patología amiloide fue desarrollado por el grupo de Games y col. (1995). Este modelo, **PDAPP**¹², sobreexpresa el APP_{V717F} (mutación Indiana) bajo el control del promotor del factor de crecimiento plaquetario (PDGF; del inglés *platelet-derived growth factor*), y muestra déficits cognitivos a los 4 meses de edad (Chen y col., 2000) y las placas amiloides a los 6 meses (Games y col., 1995). Además, este modelo muestra neuritas distróficas, pérdida sináptica, astrocitosis y microgliosis (Neha y col., 2014). No presenta ovillos ni pérdida neuronal.

En 1996, el grupo de Hsiao y col. generó la línea **Tg2576**, que sobreexpresa la isoforma 695 del APP con la doble mutación *Swedish* (K670N, M671L) bajo el control del promotor de la proteína priónica de hámster (PrP), mostrando un incremento de 5 veces en la cantidad de A β 40 y de 14 veces en la ratio A β 42/40 y una gran cantidad de placas (9-11 meses) y neuritas distróficas (Woodhouse y col., 2009). Además, se produce una pérdida de inmunoreactividad para sinaptofisina en el hipocampo aunque sin pérdida neuronal (Irizarry col., 1997), activación microglial con producción de citoquinas (El Khoury y col., 2007) y déficits cognitivos a partir de los 5 meses. No presenta ovillos neurofibrilares.

El modelo **APP23** sobreexpresa la isoforma humana APP₇₅₁ con la doble mutación *Swedish* bajo control del promotor Thy-1 murino (Sturchler-Pierrat y col., 1997). Presenta depósitos de A β a los 6 meses y déficits cognitivos desde los 3 meses (Prut y col., 2007), activación glial (Bornemann y col., 2001), pérdida sináptica, hiperfosforilación de Tau (aunque no aparecen ovillos) y neuritas distróficas (Sturchler-Pierrat y Staufenbiel, 2000). La pérdida neuronal es moderada en la neocorteza y el hipocampo (Bondolfi y col., 2002), pero es acusada en el *locus coeruleus* (Heneka y col., 2006). Además, este modelo muestra una prominente angiopatía amiloide (Beckmann y col., 2003). El modelo con la mutación *Swedish* bajo el promotor PrP (del inglés, *prion protein*), denominado **C3-3** (Borchelt y col., 1996), no es capaz de desarrollar placas extracelulares, incluso a los 18 meses.

¹¹ Hoy en día existen más de 40 tipos diferentes de animales transgénicos APP y más de 20 que expresan APP junto con otros genes relacionados, como *PS1* y *TAU* (www.alzforum.org).

¹² Este modelo fue utilizado para estudiar el papel APOE en la deposición del A β , al ser cruzado con un ratón *knockout* para *APOE*. En ausencia de APOE, la deposición del péptido amiloide se reduce significativamente, sugiriendo un papel de esta apolipoproteína en la deposición amiloide (Bales y col., 1997).

En 2001, Chishti y col. describieron el modelo **TgCRND8**, que sobreexpresa el *APP* con las mutaciones *Swedish* e *Indiana*, bajo el promotor PrP, que muestra daño cognitivo y placas a los 3 meses (ver revisión Webster y col., 2014). Por último, el modelo **J20**, que expresa las mutaciones del modelo anterior pero bajo el promotor PDGF, fue desarrollado por Mucke y col. (2000). En éste, los primeros déficits cognitivos se observan muy temprano (1-2 meses); sin embargo, los déficits no progresan con la edad y no se han observado en animales de edades avanzadas (Karl y col., 2012). Las placas aparecen a los 5-7 meses, acompañada por una reducción en los niveles de sinaptofisina. Presenta, además, pérdida neuronal temprana acompañada por activación glial (Wright y col., 2013).

1.2.2. Modelos transgénicos monogénicos basados en PS

El estudio con ratones transgénicos que sobreexpresan la forma humana mutada de *PS1* muestran que esta sobreexpresión incrementa los niveles de A β 42 (Borchelt y col., 1996; Citron y col., 1997; Jankowsky y col., 2004; Elder y col., 2010a). Estos niveles también aparecen elevados en ratones transgénicos *PS2* (Oyama y col., 1998) y en *knock-in* para *PS1* (Nakano y col., 1999). Aunque estos resultados confirman que la mutación en *PS* tiene un efecto en el procesamiento de APP, los transgénicos *PS1* no muestran formación de placas amiloides (Borchelt y col., 1996), y esto puede ser debido a que el A β de ratón tiene propiedades de agregación diferentes al humano (Jankowsky y col., 2007), específicamente en su tendencia a no formar agregados fibrilares, aunque Tanemura y col. (2006) encontraron inclusiones positivas para Rojo congo y Tioflavina S en neuronas piramidales del hipocampo que recordaban a NFTs en el modelo *knock-in* *PS1*_{I213T}.

Debido a la falta de patología de placas, los ratones transgénicos *PS* han sido menos utilizados que los *APP*. No obstante, estos modelos muestran pérdida neuronal y sináptica relacionada con la edad, así como patología vascular y daño en la neurogénesis hipocampal (ver revisión Elder y col., 2010a). En este sentido, Chui y col. (1999), fueron los primeros en describir un fenotipo neurodegenerativo en el ratón transgénico *PS1*_{L286V}, mostrando una pérdida neuronal en el hipocampo y la neocorteza. Además, se ha mostrado una pérdida sináptica en modelos con la mutación M146L (Rutten y col., 2005) y A246E (Priller y col., 2007). Se ha propuesto que las mutaciones en *PS* incrementan la susceptibilidad neuronal al daño excitotóxico, ya que las neuronas con mutaciones en *PS1* liberan una cantidad excesiva de calcio desde el RE (Small, 2009). Por otro lado, se ha observado una reducción en la fosforilación del residuo Ser9 de GSK-3 β , que se relaciona con un incremento en su actividad enzimática, en modelos *PS1* (Tanemura y col., 2006; Dewachter y col., 2008), dando lugar a la hiperfosforilación de Tau. Además, se ha mostrado un incremento en el estrés oxidativo y la peroxidación lipídica y proteica en ratones *PS1*. Por último, se han detectado déficits de aprendizaje y memoria en modelos transgénicos para *PS*, aunque son sutiles (ver revisión Elder y col., 2010a).

1.2.3. Modelos transgénicos bigénicos PS1/APP

Los ratones transgénicos que coexpresan PS1 y APP desarrollan numerosos depósitos amiloides, mucho más temprano que los animales de la misma edad que expresan solo uno de los genes mutados (Borchelt y col., 1996; Matarin y col., 2015). Por ello, se empezaron a generar animales doble transgénicos.

En 1998, Holcomb describió el modelo **APPxPS1**, que sobreexpresa la APP_{SWE} bajo el promotor PrP y la PS1_{M146L} bajo el promotor PDGF. Los primeros déficits cognitivos aparecen a los 4-5 meses (Dineley y col., 2002). El modelo **PS1^{ΔE9}/APP_{SWE}**, bajo el promotor PrP en un única inserción genómica, presenta déficits cognitivos a los 3 meses (Jankowsky y col., 2001) con fallos en el laberinto acuático de Morris a los 12 (Lalonde y col., 2005). La amiloidosis cerebral está presente desde las 6-8 semanas y muestra una intensa activación glial (Ruan y col., 2009) y neuritas positivas para Tau (Kurt y col., 2003). No obstante, no presenta una pérdida neuronal masiva, aunque algunas poblaciones presentan déficits significativos, como las neuronas catecolaminérgicas del *locus coeruleus* (O'Neil y col., 2007) y las interneuronas del hipocampo (Popovic y col., 2008).

Flood y col. (2002), describieron el modelo **APP/PS1_{KI}**, que porta las mutaciones *Swedish* y *London* de APP y las mutaciones M233T/L235P de PS1, y usa un promotor endógeno para dirigir la expresión de la secuencia humana del Aβ, por lo que la patología se desarrolla en ausencia de sobreexpresión de APP o PS1. Este modelo presenta déficits cognitivos a los 7 meses (Bruce-Keller y col., 2011) y una pérdida neuronal en CA1 a los 10 meses de edad (Casas y col., 2004). El modelo **PS1/APP** (que sobreexpresa PS1_{M146L}, bajo el promotor HMG-CoA reductasa, junto con la isoforma 751 del APP con la doble mutación *Swedish* y la mutación *London*), generado por el grupo de Blanchard y col. (2003), presenta muerte neuronal en hipocampo y corteza entorrinal (Ramos y col., 2006; Moreno-González y col., 2009; Baglietto-Vargas y col., 2010). En este modelo aparecen las placas extracelulares a partir de los 3-4 meses, y presenta activación glial desde edades muy tempranas (Jiménez y col., 2008). No presenta ovillos neurofibrilares.

El modelo **5xFAD**, fue descrito por Oakley y col. (2006) y presenta la doble mutación sueca y las mutaciones Florida (I716V) y *London* (V717I) en el gen APP, y dos mutaciones en PS1 (M146L+L286V). Desarrolla déficits cognitivos a los 3 meses de edad (Ohno y col., 2006) y presenta Aβ intracelular a los 1,5 meses y deposición extracelular a partir de los 2 meses. Además, presenta pérdida neuronal a partir de los 9 meses, que afecta a las neuronas noradrenérgicas (Kalinin y col., 2012) y colinérgicas (Devi y Ohno, 2010), así como de células piramidales en la corteza cerebral y el subículo (Oakley y col., 2006).

1.2.4. Modelos transgénicos basados en TAU

A pesar que no se identificado ninguna mutación en Tau en los pacientes de Alzheimer, los ovillos neurofibrilares sólo se encuentran en animales transgénicos que

sobreexpresan la forma humana mutada de *TAU*¹³, aunque en ausencia de mutaciones *TAU* los modelos si poseen Tau hiperfosforilado especialmente en las neuritas distróficas.

La línea de animales **ALZ7** expresa *TAU* bajo el promotor murino Thy-1 en su isoforma con cuatro repeticiones (Götz y col., 1995). Estos animales desarrollan axonopatía central y periférica, con axones dilatados, esféricos y filamentos helicoidales que no llegan a formar ovillos. La línea **8c** sobreexpresa *TAU* humano con los 14 exones. Este animal presenta Tau en neuritas y sinapsis, pero no en los cuerpos celulares (Duff y col., 2000). Los animales **Htau** se obtienen por el cruce de animales *TAU knockout* y animales 8c (Andorfer y col., 2003) y expresan exclusivamente las 6 isoformas normales humanas, sin el Tau murino. Estos animales presentan NFTs y una extensa muerte celular. Existen otros animales transgénicos para Tau que expresan varias mutaciones en el gen, como P301L, P301S, V337M y G272V. Los animales transgénicos para la Tau humana mutada en **P301L** presentan NFTs a edades tempranas, aunque no existe muerte celular (Götz y col., 2001). Los animales **P301S**, presentan filamentos de Tau a los 6 meses, NFTs a edades tempranas, atrofia en el hipocampo y la corteza entorrinal, pérdida sináptica, activación glial y muerte celular (Allen y col., 2002; Yoshiyama y col., 2007).

Los animales transgénicos APPxTAU, como el **Tg2576xP301L** (Lewis y col., 2001), poseen depósitos de A β a la misma edad que los progenitores Tg2576, aunque con una patología neurofibrilar incrementada, sugiriendo un proceso de sinergia entre la patología amiloidea y la taupatía. Por otro lado, la reducción endógena de Tau mejora o incluso rescata completamente los daños inducidos por el A β . En 2003, Oddo y col. desarrollaron un modelo triple transgénico, **3xTg-AD**, con mutaciones en los genes para APP (APP_{SWE}), Tau (P301L) y PS1 (M146L), bajo el promotor Thy-1.2 murino. Este modelo muestra daños cognitivos a edades tempranas (3-5 meses; Webster y col., 2014). La acumulación de A β intracelular es el primer evento, seguido de la hiperfosforilación de Tau, deposición de A β extracelular y aparición de NFTs (Oddo y col., 2003; Mastrangelo y Bowers, 2008). Además presenta una pérdida noradrenérgica (Manaye y col., 2013) y colinérgica (Girao da Cruz y col., 2012), y una activación microglial. Sin embargo, no hay una pérdida neuronal en el hipocampo, aunque si presenta disfunción sináptica. Este modelo ofrece la posibilidad de probar la interacción entre A β y Tau (Oddo y col., 2007). Sin embargo, la expresión de los tres genes a la vez, no permite analizar la implicación patológica de cada uno en la EA. Un año después, Boutajangout y col. (2004), desarrollaron un animal triple tg **PS1xAPPxTAU** sin mutaciones en *TAU* (PS1_{M146L}, APP_{751SL}, hTAU_{3R}), que muestra placas a partir de los 2,5 meses, acumulación somatodendrítica de Tau, neuritas distróficas con Tau hiperfosforilado. Sin embargo, no existen NFTs ni a los 18 meses.

¹³ En la EA no aparece asociada ninguna mutación en el gen *TAU*, por lo que estos modelos no son útiles para conocer las causas de la enfermedad, aunque sí lo son para conocer su relación con el péptido A β en los animales que desarrollan placas (Duyckaerts y col., 2008).

1.2.5. Animales transgénicos inducibles

Un modelo inducible permite el estudio de la formación de las placas tras la inactivación del transgen (hAPP695_{SI}), simulando como si la patología amiloide no progresara (aunque tampoco revierte, ya que los depósitos son estables). La inactivación del transgen simula el paro de la producción de A β que se esperaría tras la aplicación de un tratamiento que inhibiera las enzimas secretasas. El núcleo amiloide produce la misma inflamación y está rodeado por neuritas distróficas (Jankowsky y col., 2005). También, se han generado transgénicos inducibles para Tau (SantaCruz y col., 2005).

En la Tabla 1.1 se muestran los principales ratones transgénicos para la EA desarrollados. Pese a todo, aún no se ha conseguido obtener un modelo que reúna todos los aspectos de la enfermedad, lo que refleja las limitaciones de utilizar un sistema roedor para reproducir una enfermedad humana que involucra varias décadas de desarrollo y que afecta a las funciones cognitivas superiores. Sin embargo, estas líneas reproducen algunas de las características de la EA y se utilizan para la realización de ensayos preclínicos (Van Dam y De Deyn, 2011). Recientemente se han desarrollado ratas transgénicas como modelos de la EA (Do Carmo y Cuello, 2013). De éstas, las ratas **TgF344-AD** coexpresan el APP_{SWE} humano y el PS1d9 (Cohen y col., 2013) y desarrollan las lesiones típicas observadas en los ratones transgénicos de la enfermedad, mostrando, además, taupatía y muerte neuronal, y, por tanto, mimetizan aún más la patología.

Tabla 1.1. Resumen de los principales modelos transgénicos murinos para la EA. En la tabla se muestra el tipo de animal, el nombre de la línea por el que se conoce, las mutaciones o genes sobreexpresados, las características patológicas más notables y la referencia bibliográfica. PS1: Presenilina 1; hAPP: proteína precursora amiloide humana; NFTs: ovillos neurofibrilares; S: mutación sueca (K670N/M671L); L: mutación londinense (V717I); I: mutación india (V717F); F: mutación florida (I716V); D: mutación *Dutch*; KO: *knockout*; KI: *knock-in*; 4R: isoforma de Tau con 4 repeticiones (Datos obtenidos de Bayer y Wirths, 2008; Ashe y Zahs, 2010; y el resto de referencias indicadas).

MODELOS MONOGÉNICOS				
GEN	LÍNEA	MUTACIÓN	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIAS
PS1	S9	PS1dE9	Incrementa la formación de placas	Thinakaran y col., 1996
	S8-4	HuPS1	Sin placas amiloides	Borchelt y col., 1997
	N-5	hAAP A246E	Sin placas amiloides	Borchelt y col., 1997
	PS1 _{KO}	Sin PS1	Inviable	Shen y col., 1997
APP	PDAPP	hAPP _I (V717F)	Depósitos desde los 6 meses. Gliosis. Sin NFTs	Games y col., 1995
	Tg2576	hAPP695 _S (K670N/M671L)	Placas desde los 9-11 meses. Fallos sinápticos. Sin NFTs.	Hsiao y col., 1996
	C3-3	hAPP695 _S	Sin placas amiloides	Borchelt y col., 1996
	APP23	hAPP751 _S	Placas desde los 6 meses. Gliosis. Muerte celular. Sin NFTs	Sturchler Pierat y col., 1997
	APP <i>Dutch</i>	hAPP751 _D (E693Q)	Angiopatía amiloide cerebral	Herzig y col., 2001
	CRND8	hAPP695 _{SI}	Placas desde los 3 meses. Incremento de A β ₄₂ /A β ₄₀	Chishti y col., 2001

	hAPP695	hAPP695 _{SL} inducible	Con la inhibición génica el tamaño de los depósitos amiloides se reduce	Jankowsky y col., 2005
	J20	APP _{SI}	Placas desde los 5-7 meses. Déficits cognitivos 1-2 meses	Mucke y col., 2000
TAU	ALZ7	Sobre-expresión de 4 repeticiones de tau (4R)	Presentan axonopatía sin formación de NFTs	Götz y col., 1995
	JNPL3	4R Tau P301L	NFT	Lewis y col., 2000
	8c	Expresión de tau humano	Tau en neuritas y sinapsis, no en somas	Duff y col., 2000
	Tau P301L	4R Tau P301L	Sin muerte celular y con NFT de aparición temprana	Götz, 2001
	Tau P301S	4R Tau P301S	Fallos sinápticos (3 meses). Microgliosis y muerte celular. NFTs a edades tempranas	Allen y col., 2002; Yoshiyama y col., 2007
	Tau V337M	4R Tau V337M	NFT desde 6 meses	Tanemura y col., 2001
	Tau R406W	4R Tau R406W	NFT desde 18 meses	Tatebayashi y col., 2002
	HTau	TauKO x 8c	Existe muerte neuronal sin NFTs	Andorfer y col., 2003
	rTg4510	4R Tau P301L inducible	NFT y pérdida neuronal. Inhibición no evita formación de nuevos NFT	Ramsden y col., 2005; SantaCruz y col., 2005
	DM-hTau	2-3-4R Tau K257T/P301S	NFT desde 6 meses	Rosenmann y col., 2008

MODELOS BIGÉNICOS

GEN	LÍNEA	MUTACIÓN	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIAS
PS1/ APP	AP/PS	C3-3xN-5 APP _S x HuPS1 A246E	Depósitos extracelulares desde los 9 meses	Borchelt y col., 1996
	PSAPP	Tg2576 x PS1 _{M146L}	Depósitos extracelulares desde los 6 meses de edad	Holcomb y col., 1998
	PS1d9/ APPs	PS1d9 x APPs	Placas desde las 6-8 semanas. Activación glial.	Jankowsky y col., 2001
	PS1/APP	PS1 _{M146L} x APP _{SL}	Depósitos extracelulares desde los 3-4 meses de edad. Gliosis. Muerte de neuronas piramidales y de interneuronas	Blanchard y col., 2003; Ramos y col., 2006
	APP _{SL} PS1 _{KI}	APP751 _{SL} x PS1 _{KI} (M233T/L235P)	Patología muy agresiva. Pérdida de neuronas CA1 desde los 6 meses	Casas y col., 2004
	5xFAD	APP751 _{SFL} x PS1 (M146L/L286V)	Niveles altos de Aβ ₄₂ desde 1,5 meses. Placas extra-celulares desde 2 meses	Oakley y col., 2006
APP/ TAU	TAPP	Tg2576 x TauJNPL3	Placas desde 8,5 meses. NFT	Lewis y col., 2001
	APP _{SWE} Tau _{V₁LW}	APP _S x Tau G272V/P301L/R406W	Placas desde 9 meses. NFT a 25 meses. Muerte neuronal a 16 meses	Ribé y col., 2005; DaRocha-Souto y col., 2011

MODELOS TRIGÉNICOS

GEN	LÍNEA	MUTACIÓN	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIAS
PS1/ APP/ TAU	3xTg-AD	PS1 _{M146L} x APP _S x Tau P301L	Placas desde 6 meses. NFT desde 9 meses. Fallos sinápticos	Oddo y col., 2003
	PS1/APP/ TAU	PS1 _{M146L} xAPP751 _{SL} , hTAU(3R)	Placas (2,5 meses) y axones distróficos. Sin NFT	Boutajangout y col., 2004

Estrategias

1.3. terapéuticas para el Alzheimer

Aunque la patogénesis de la EA no se conoce completamente, se han desarrollado diversas estrategias farmacológicas para su tratamiento (<http://www.alz.org/trialmatch>), aunque hasta la fecha no existe ninguna eficaz en parar o retrasar la enfermedad.

El proceso de desarrollo y aprobación de un fármaco es largo y costoso y se lleva a cabo a través de diferentes fases (Fig. 1.15). Las primeras fases (no clínicas) incluyen los ensayos *in vitro* e *in vivo*. Para éstos últimos se utilizan modelos animales, que para la EA, como se ha comentado previamente, existen multitud (ver Apdo. 1.2). Es la eficacia del fármaco en los ensayos preclínicos la que determina el paso de éste a fases clínicas en humanos. Los ensayos clínicos en humanos, diseñados para determinar la seguridad, la posología adecuada, la eficacia, las reacciones adversas y los efectos del uso a largo plazo de un medicamento nuevo, se realizan en tres fases sucesivas (fases 1, 2 y 3) y en cada fase se evalúa un número progresivamente mayor de individuos. La primera fase suele realizarse con individuos sanos, utilizándose pacientes en las fases posteriores.

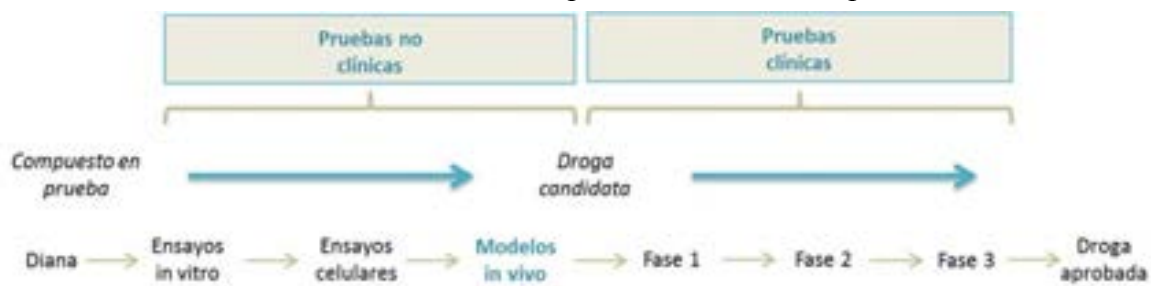


Figura 1.15. Evolución de un tratamiento farmacológico. Desde el diseño de un fármaco hasta su aprobación es necesario pasar por diversas fases, tanto preclínicas como clínicas. El empleo de modelos animales en fases preclínicas es crucial para conocer *in vivo* el efecto del fármaco. La presente Tesis Doctoral

emplea modelos animales de la EA tanto para caracterizar el proceso neurodegenerativo de la enfermedad, como para evaluar el posible efecto terapéutico de potenciales fármacos.

En la actualidad se dispone de dos tipos de terapias sintomáticas aprobadas, cuyos efectos son limitados y mejoran algunos de los síntomas, pero no tratan las causas que subyacen a la enfermedad (Huang y Mucke, 2012):

- Inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChEIs): éstos son donepezil (de Aricept, Eisai/Pfizer), galantamina (de Razadyne, Jonson&Jonson) y rivastigmina (de Exelon, Novartis). Los AChEIs incrementan los niveles de acetilcolina (ACh) al evitar su degradación por la enzima acetilcolinesterasa (AChE), mejorando la transmisión colinérgica. Los ensayos clínicos han probado una pequeña mejora en la cognición de los pacientes, pero ésta no es permanente, mostrando un declive con el tiempo (Craig y col., 2011).
- Antagonistas no competitivos de los receptores glutamatérgicos N-metil-D-aspartato (NMDA): la memantina. La descarga excesiva de glutamato está relacionada con procesos neurodegenerativos (excitotoxicidad del glutamato y posterior desequilibrio de la homeostasis del calcio) en trastornos tanto agudos (isquemia) como crónicos (EA). El clorhidrato de memantina actúa como modulador de la transmisión glutamatérgica (Reisberg y col., 2003).

A continuación, se muestran las principales estrategias terapéuticas ensayadas hasta el momento (ver revisiones Huang y Mucke, 2012; Ubhi y Masliah, 2013; Chiang y Koo, 2014; Franco y Cedazo-Minguez, 2014; Schneider y col., 2014).

1.3.1. Estrategias terapéuticas basadas en A β

La hipótesis de la cascada amiloide (ver Apdo. 1.1.7.1), que sitúa la deposición del péptido A β como un evento central en la EA, ha potenciado el uso de estrategias terapéuticas encaminadas a reducir la producción del péptido, facilitar su eliminación y/o evitar su agregación (ver revisión Karran y col., 2011; Karran y Hardy, 2014; Schneider y col., 2014). Algunos de estos fármacos han alcanzado la fase clínica 3 (Tabla 1.2).

Para **disminuir la producción de A β** , se han diseñado inhibidores de γ - y β -secretasa (ver Apdo. 1.1.3.3). Los inhibidores de γ -secretasa, semagacestat y avagacestat, no han mostrado un efecto positivo sobre el declive cognitivo, y además, muestran diversos efectos secundarios debido a la gran variedad de sustratos de esta enzima, pese a los resultados obtenidos en modelos transgénicos de la EA y en fase 1 (Bateman y col., 2009). El tarenflurbil (R-Flurbiprofeno) es un AINE (antiinflamatorios no esteroideo) que actúa como modulador de γ -secretasa, sin afectar al procesamiento de Notch, y se ha estudiado en fase 3 (Karran y Hardy, 2014). Con respecto a los inhibidores de BACE-1 (Rajendran y Annaert, 2012), su gran sitio catalítico dificulta esta diana, aunque los

inhibidores MK-8931 (Merck) y LY2886721 (Eli Lilly) se encuentran en fase clínica mostrando una reducción del 80-90% de los niveles de A β en el líquido cefalorraquídeo (Chiang y Koo, 2014; Menting y Claassen, 2014). Sin embargo, hay dudas sobre su eficacia en pacientes con EA moderada, donde las placas de A β ya se han formado, ya que los inhibidores de BACE-1 evitan la producción del péptido, pero no tienen por qué afectar a los péptidos ya existentes. Una alternativa, para la disminución de la producción del péptido, consistiría en desviar el metabolismo del APP hacia la ruta no amiloidogénica (ver Apdo. 1.1.3.3). Por otro lado, dado que los péptidos de A β se generan principalmente en el compartimento endosomal, se ha propuesto éste como una diana efectiva, utilizando, por ejemplo, agentes que neutralizan su pH (Rajendran y Annaert, 2012).

Nombre de la droga	Mecanismo de acción propuesto	Resultados obtenidos en fase 3
Tramiprosate	Inhibidor de la agregación de A β	Sin efectos significativos en ADAS-cog y CDR-SB (Aisen y col., 2011).
Tarenflurbil	Modulador de γ -secretasa	Sin efectos significativos en ADAS-cog y ADCS-ADL (Green y col., 2009).
Semagacestat	Inhibidor de γ -secretasa	Ensayos detenidos por incremento en la incidencia de cáncer de piel y empeoramiento en la cognición y actividades de la vida diaria (Doody y col., 2013).
Bapineuzumab	Anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra los aminoácidos 1-5 del péptido A β . Eliminación de las placas amiloides mediada por la activación microglial	Ensayos detenidos por no obtener resultados positivos en ADAS-cog y actividades de la vida diaria (Salloway y col., 2014).
Solanezumab	Anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra los aminoácidos 16-24 del péptido A β . Eliminación de placas amiloides mediada por equilibrio con el A β periférico	Los ensayos no mostraron efectos positivos en ADAS-cog y ADCS-ADL. Un segundo análisis mostró un efecto significativo en la cognición (Doody y col., 2014).
Gammagard	Inmunoglobulina intravenosa	Datos del ensayo no publicados.

Tabla 1.2. Resultados obtenidos en ensayos en fase clínica 3 con drogas centradas en el A β (Adaptado de Karran y Hardy, 2014). ADAS-cog: del inglés *Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive Subscale* (Mohs y col., 1997); ADCS-ADL: *Alzheimer's Disease Cooperative Study-Activities of Daily Living Inventory* (Galasko y col., 1997); CDR-SB: *Clinical Dementia Rating-Sum of Boxes* (Morris, 1993).

Para **facilitar su eliminación** se propone la activación de proteasas extracelulares capaces de degradar el A β (Yamada y Nabeshima, 2000). Asimismo, el agonista de APOE4, bexaroteno (Targetin®), que regula la expresión de APOE4, es un tratamiento del linfoma de células T y está siendo ensayado en fase 2 por su efecto en la eliminación del A β (Chiang y Koo, 2014).

Se han estudiado agentes capaces de **inhibir la agregación** del péptido amiloide (Yamada y Nabeshima, 2000), como la rifampicina (Tomiyama y col., 1997), los bezofuranos (Howlett y col., 1999), el PBT2 (Lannfelt y col., 2008), el scyllo-inositol, que mostró eficacia en fase 2 (Salloway y col., 2011) y el tramiprosate (ensayado en fase 3; Karran y Hardy, 2014). Por otro lado, las chaperonas, que marcan las proteínas mal plegadas para su degradación, como las proteínas del choque térmico (HSP, del inglés *heat shock protein*), pueden suprimir la agregación del A β (Ubhi y Masliah, 2013). Así, se ha

visto que una chaperona, el dominio Brichos, puede actuar en el ciclo de fibrilización-oligomerización del A β , al interactuar con el A β fibrilar, conduciendo a una reducción en la formación de oligómeros tóxicos sin afectar a la carga fibrilar (Cohen y col., 2015).

Las estrategias más recientes se han centrado en la **inmunoterapia** para el péptido A β ¹⁴ (Wisniewski y Goñi, 2015). La inmunización pasiva se ha ensayado en fase 3 con los fármacos bapineuzumab (Elan/Pfizer/Jonson&Jonson) y solanezumab (Eli Lilly), sin beneficios sobre el declive cognitivo (Iqbal y col., 2014; Karran y Hardy, 2014). La inmunización activa contra el A β , elimina las placas en un modelo transgénico APP (Schenk y col., 1999); sin embargo, el ensayo de inmunoterapia activa usando el péptido A β 42 (AN1792, Elan), terminó en fase 2 debido al desarrollo de meningoencefalitis (Chiang y Koo, 2014). Posteriormente, se desarrolló un anticuerpo monoclonal, mAb158, contra las protofibrillas del A β , cuya versión humanizada, BAN2401, ha entrado en fase 3 sin efectos positivos sobre la cognición (Lannfelt y col., 2014).

El fracaso de la inmunoterapia puede deberse a que el tratamiento de la enfermedad en una fase moderada sea demasiado tarde, y debería aplicarse en una fase asintomática. Por ello, en la actualidad, se encuentran en proceso varios estudios centrados en etapas tempranas de la EA (Miller, 2012; Karran y Hardy, 2014). Uno de ellos, la iniciativa para la prevención del Alzheimer (API, del inglés *Alzheimer's Prevention Initiative*) implica a 200 miembros de una población colombiana, portadores de una mutación en *PS1* (E280A; Fleisher y col., 2012), que recibirán crenezumab (un anticuerpo anti-A β) durante 5 años. La red de Alzheimer hereditario dominante (DIAN, del inglés *The Dominantly Inherited Alzheimer's Network*) incluye a 160 portadores de mutaciones del Alzheimer familiar que se tratarán con gantenerumab (anticuerpo anti-A β , de Roche) y solanezumab (de Lilly) durante 2 años. Por último, el Estudio del tratamiento antiamiloido en la enfermedad de Alzheimer asintomática o estudio A4 (en inglés, *Anti-Amyloid Treatment in Asymptomatic Alzheimer's Disease study*), se lleva a cabo en 1000 pacientes cognitivamente normales pero que han dado positivo en análisis por PET, y recibirán solanezumab durante 3 años. Los primeros resultados de esta inmunoterapia en fase asintomática se obtendrán en 2016.

1.3.2. Estrategias centradas en Tau

Los fallos en las terapias basadas en A β han hecho que haya crecido el interés en estrategias terapéuticas centradas en Tau (ver revisión Huang y Mucke, 2012; Iqbal y col., 2014; Schneider y col., 2014).

¹⁴ La inmunoterapia activa consiste en la administración de un inmunógeno para estimular la producción endógena de anticuerpos; mientras que la inmunoterapia pasiva emplea anticuerpos pregenerados. Esta estrategia podría eliminar el A β del cerebro mediante tres mecanismos: (i) opsonización del A β , seguido de fagocitosis; (ii) la eliminación del A β en la periferia mediada por anticuerpos, que estimula un equilibrio con el tejido cerebral, disminuyendo su carga amiloide; y (iii) unión de los anticuerpos a los monómeros, induciendo un cambio conformacional que disminuye su capacidad de oligomerización y/o fibrilización.

Una de las estrategias propuestas consiste en la **modulación de la fosforilación de Tau** (Medina y Avila, 2014). Para ello, las quinasas de Tau se presentan como dianas terapéuticas. Sin embargo, de manera similar a lo que ocurría con γ -secretasa, todas las quinasas de Tau tienen múltiples sustratos, por lo que se dificulta el uso de sus inhibidores en ensayos (Huang y Mucke, 2012). Muchos estudios con inhibidores de GSK-3 β , como el litio, han mostrado que la modulación de su actividad enzimática puede ser neuroprotectora (Dolan y Johnson, 2010), ya no solo a través de su efecto sobre Tau sino también por su capacidad para reducir los niveles de A β (Rockenstein y col., 2007). El inhibidor irreversible de GSK-3 β , tidadglusib (NP-12, de Noscira), llegó a fase 2b donde fracasó al ser utilizado en pacientes con MCI (Chiang y Koo, 2014; Medina y Avila, 2014).

Además de la inhibición de la hiperfosforilación de Tau, se propone una estrategia terapéutica alternativa centrada en recuperar la actividad de la fosfatasa PP2A (Iqbal y col., 2014; Medina y Avila, 2014). El tratamiento de un transgénico para Tau con selenato de sodio (activador de PP2A) redujo la hiperfosforilación de Tau y la formación de ovillos, mejoró la memoria y evitó la neurodegeneración (Franco y Cedazo-Minguez, 2014). La metformina, droga utilizada para el tratamiento de la diabetes tipo II, también estimula la actividad de PP2A *in vitro* e incrementa la neurogénesis y mejora el aprendizaje en animales y, además, puede afectar a la producción de A β y se encuentra actualmente en fase 2. La sal de selenio también potencia la actividad PP2A, reduciendo la fosforilación de Tau y la formación de NFT en un ratón transgénico para Tau y en 2014 se completaron los ensayos en fase 3 (ver revisión Chiang y Koo, 2014).

Otra alternativa consistiría en disminuir los niveles de Tau fosforilado, al incrementar su degradación. Para ello se ha propuesto, su eliminación mediante la respuesta inmune. Estudios llevados a cabo con **inmunización** activa contra Tau fosforilado muestran una reducción en las inclusiones y la disfunción neuronal en modelos animales TAU (Asuni y col., 2007; Huang y Mucke, 2012; Medina y Avila, 2014). Actualmente, un ensayo con vacunas de Tau se encuentra en fase 2 (Iqbal y col., 2014).

Por otro lado, se propone **inhibir la agregación de Tau**. El azul de metileno (TauRx Therapeutics, LMTXTM, TRx0237) se encuentra en fase 3 (Franco y Cedazo-Minguez, 2014; Medina y Avila, 2014). Su mecanismo de acción es desconocido, ya que tiene efectos pleiotrópicos y podría actuar evitando la agregación de Tau, estimulando la autofagia (Friedman y col., 2015) o incrementando la actividad del proteasoma. Estudios con modelos animales ha mostrado una reducción en los niveles de Tau fosforilado, un aumento en los marcadores de autofagia y mejora cognitiva (Congdon y col., 2012). Precisamente en relación con la **autofagia**, se están ensayando estrategias terapéuticas (Friedman y col., 2015). Así, la rapamicina, un antibiótico e inmunosupresor, incrementa el proceso autofágico reduciendo los niveles de A β en una línea celular que expresa APP y en el modelo 3xTg-AD, donde además reduce los niveles de Tau fosforilado y los déficits de

memoria (Caccamo y col., 2010). La trealosa disminuye la acumulación de A β y Tau, recupera los déficits de memoria (Du y col., 2013) e incrementa la autofagia en modelos.

La alteración de los microtúbulos se ha observado en diversos modelos de la EA, por lo que los **estabilizadores de microtúbulos** se muestran como una promesa en ensayos preclínicos y clínicos (Franco y Cedazo-Minguez, 2014; Medina y Avila, 2014). Por ejemplo, paclitaxel evita la toxicidad inducida por A β en cultivos celulares, así como los déficits en el transporte axonal (Zhang y col., 2005). La eprotilona D, que tiene una mayor permeabilidad a la barrera hematoencefálica, mejora la densidad de microtúbulos y la cognición en un modelo transgénico para Tau (Brunden y col., 2010) y se está ensayando en fase 1 (Chiang y Koo, 2014). El péptido NAP (davunetide, AL-108; Allon Therapeutics Inc.) estabiliza los microtúbulos y reduce la hiperfosforilación de Tau (Vulih-Shultzman y col., 2007) y ha sido usado en ensayos clínicos en fase 2 (Gozes y col., 2009).

1.3.3. Estrategias colinérgicas

La hipótesis colinérgica (ver Apdo. 1.1.7.3) ha dado lugar al desarrollo de terapias centradas en el sistema colinérgico. Además de los ya nombrados AChEIs, otra posibilidad terapéutica es la mejora de la actividad colinérgica por la modulación directa de los receptores muscarínicos (mAChRs) (ver revisión Pákási y Kálmán, 2008).

1.3.4. Terapias antiinflamatorias

La inflamación contribuye a la patogénesis de la EA (Apdo. 1.1.7.5) y estudios epidemiológicos han mostrado que el uso de AINE reduce el riesgo de padecer la enfermedad (Birch y col., 2014). Las principales terapias antiinflamatorias son:

- AINE: Sus efectos beneficiosos están asociados con una reducción en la producción o agregación del A β y la fosforilación de Tau (Sastre y Gentleman, 2010). El tratamiento de un modelo de la EA con CHF5074, resulta en una modulación de la producción de A β 42 por γ -secretasa, sin afectar al procesamiento de Notch, dando lugar a una disminución de los déficits de memoria, activación glial y pérdida neuronal (Sivilia y col., 2013). Otra diana potencial de los AINE es COX-1. Se ha mostrado que el tratamiento del triple transgénico con un inhibidor de COX-1 (SC-560), mejora el aprendizaje y reduce la carga amiloide, la hiperfosforilación de Tau y la activación glial (Choi y col., 2013). Sin embargo, los ensayos clínicos han fallado en reproducir los efectos beneficiosos de los AINE en pacientes de la EA (ver revisión Latta y col., 2014), y es que el éxito de esta terapia parece ser dependiente del estadio de la enfermedad en el que se inicie (Lichtenstein y col., 2010), ya que sus beneficios parecen ser preventivos más que terapéuticos.
- Agonistas de PPAR γ (del inglés *peroxisome proliferator-activated receptor- γ*): PPAR γ es un receptor nuclear que regula la transcripción de genes proinflamatorios

como *IL-1 β* e *iNOS*. El tratamiento con el agonista, pioglitazone, en modelos de la EA, resulta en una reducción de la microglía activada (Heneka y col., 2005), y un incremento en la memoria de los pacientes (Hanyu y col., 2009). Además, los activadores de este receptor disminuyen los niveles de A β bajo condiciones inflamatorias, al afectar a la transcripción de *BACE* (Sastre y col., 2003).

- Minociclina: derivado de la ciclina con poder antiinflamatorio y con propiedades neuroprotectoras (Noble y col., 2009). Protege contra la muerte celular inducida por A β , evitando su fibrilización y su deposición, reduciendo los niveles de *iNOS*, y evitando el declive cognitivo en un modelo APP (Seabrook y col., 2006). Además, disminuye la expresión de marcadores microgliales M1, sin afectar a la de marcadores M2 (Kobayashi y col., 2013), por lo que la minociclina puede inhibir selectivamente la polarización de la microglía a un estado proinflamatorio.
- Anti-TNF- α : El anticuerpo contra TNF- α , infliximab, reduce los niveles de A β y la fosforilación de Tau en un modelo de la enfermedad (Shi y col., 2011). Por otro lado, el inhibidor de TNF- α talidomida, tiene capacidad anti-tumoral, anti-angiogénica y antiinflamatoria, y su administración en un modelo ha dado lugar a una reducción en la activación glial, la carga amiloide y la fosforilación de Tau (He y col., 2013), con un descenso en los niveles y actividad de BACE-1.
- IL-4: Otro tratamiento consistiría en conducir la respuesta inmune a un perfil M2a, mediante la liberación de la citoquina antiinflamatoria IL-4. El tratamiento con IL-4 en un modelo de la EA ha inducido un fenotipo M2 e incrementado la eliminación microglial de A β (Shimizu y col., 2008). De hecho, el incremento de la producción de IL-4 puede ser responsable, parcialmente, de los efectos terapéuticos de los AChEIs utilizados actualmente (Lugaresi y col., 2004).
- Bloqueo de TNFSF10: TNFSF10 es una citoquina proapoptótica, cuyo bloqueo, mediante un anticuerpo monoclonal, atenúa la neurotoxicidad inducida por A β en el modelo triple transgénico, produciendo una mejora cognitiva y reduciendo los niveles inflamatorios y de A β (Cantarella y col., 2015).

1.3.5. Terapias antioxidantes y uso de factores neurotróficos

El apoyo a la hipótesis del estrés oxidativo (ver Apdo. 1.1.7.6) ha dado lugar al desarrollo de terapias antioxidantes para la EA, ya que éstos protegen a las neuronas de la toxicidad inducida por A β . Sin embargo, los estudios clínicos llevados a cabo con antioxidantes, no prueban un claro efecto beneficioso (Persson y col., 2014). Dichos ensayos incluyen el tratamiento con vitamina C y E, ácido α -lipoico, curcumina, *ginkgo biloba*, *memory XL* (que contiene ácido fólico, vitaminas B12 y E, etc.), estrógenos, etc.

Los factores neurotróficos (NFs) son proteínas que promueven la diferenciación y desarrollo de neuronas. NFs como BDNF están alterados en la EA (Zuccato y Cattaneo,

2009), por lo que podrían ser una potencial estrategia terapéutica. Así, BDNF tiene efectos neuroprotectores en modelos animales de la EA (Nagahara y col., 2009).

1.3.6. Estatinas

Estudios epidemiológicos apoyan que la hipercolesterolemia se correlaciona con el riesgo de padecer la EA (Ricciarelli y col., 2012). Además, el polimorfismo de APOE es considerado un factor de riesgo de la enfermedad. Por ello, se ha considerado que las estatinas, que se utilizan para tratar niveles altos de colesterol, pueden ser una terapia efectiva. Datos obtenidos en estudios realizados con modelos sugieren que los efectos beneficiosos de las estatinas en la EA se deben a una reducción de la producción del A β , de la actividad de BACE-1 y del estrés oxidativo (ver revisión Barone y col., 2014). Sin embargo, la importancia de este tratamiento se encuentra aún bajo debate, dado que algunos ensayos clínicos no muestran un beneficio significativo sobre la cognición (Sanchez-Ferro y col., 2013; Barone y col., 2014).

1.3.7. Terapia con células madre

Recientemente, se ha propuesto como tratamiento el trasplante de células madre derivadas de cordón umbilical humano en el cerebro de animales transgénicos de la EA. El tratamiento mejora los déficits cognitivos e incrementa la supervivencia neuronal, reduce los niveles de A β y la activación microglial (Choi y col., 2014).

1.3.8. Terapia multimodal

Dado los múltiples mecanismos implicados en la EA, es probable que se requiera una tratamiento multimodal (Ubhi y Masliah, 2013), como la cerebrolisina (CBL), que ha mostrado efectos beneficiosos tanto en modelos transgénicos como en pacientes. CBL está compuesto de péptidos pequeños con actividad neurotrófica y presenta protección de neuronas colinérgicas, reduce los déficits sinápticos y de comportamiento (Rockenstein y col., 2005) y mejora la cognición en pacientes con daño moderado (Alvarez y col., 2011).

La batería de compuestos efectivos en modelos animales de la EA crece constantemente (ver revisión Franco y Cedazo-Minguez, 2014), aunque la traslación de estas intervenciones preclínicas a fases clínicas es bastante pobre debido, probablemente, a la falta de buenos modelos animales y biomarcadores para la progresión de la enfermedad. El principal problema al que nos enfrentamos es que los ensayos se llevan a cabo en pacientes que ya presentan un daño cognitivo y sería necesario irse a estadios anteriores, centrando la búsqueda en tratamientos preventivos.

Puesto que no hay tratamientos que funcionen y dada la probabilidad de que la enfermedad de Alzheimer alcance proporciones de epidemia, es fundamental seguir trabajando en modelos animales y evaluar nuevas terapias.

1.4.

Planteamiento del trabajo y objetivos

La EA constituye uno de los problemas socio-sanitarios más importantes de nuestra época, debido a la ausencia de terapias efectivas y a la alta incidencia de esta enfermedad en individuos de edad avanzada, hecho que se ve agravado con el progresivo aumento de la esperanza de vida y envejecimiento de la población en los países desarrollados. La etiología de esta enfermedad multifactorial no es conocida y, actualmente, no existen tratamientos farmacológicos efectivos para paliar o retrasar las deficiencias neurológicas que se producen durante su evolución. La ausencia de terapias efectivas es debida, principalmente, a la ausencia de buenos modelos animales, de marcadores moleculares de la enfermedad y de dianas selectivas. Disponer de modelos animales que mimeticen todas las alteraciones neuropatológicas que presentan los pacientes con Alzheimer es clave para avanzar en la lucha contra esta devastadora enfermedad, ya que son herramientas de gran valor para probar *in vivo* los posibles efectos terapéuticos de fármacos potenciales. Por otro lado, estos modelos nos permiten investigar la evolución temporal de esta enfermedad desde sus estadios iniciales hasta sus fases más avanzadas. Es precisamente en estos estadios iniciales donde es prioritario conocer los cambios neuropatológicos y los mecanismos celulares/moleculares implicados en estas alteraciones, para identificar marcadores tempranos específicos de la enfermedad de relevancia clínica, y que permitan evaluar la capacidad terapéutica de posibles fármacos.

Nuestro grupo de investigación, perteneciente al Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) del Instituto de Salud Carlos III, está centrado en 1) la caracterización a nivel celular y molecular de modelos transgénicos de la EA con objeto de estudiar los mecanismos implicados en los cambios neurodegenerativos que acontecen en esta patología en las regiones más vulnerables; 2)

identificar potenciales biomarcadores de utilidad diagnóstica, así como de dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos; y 3) evaluar a nivel preclínico potenciales estrategias terapéuticas. Desde el año 2003, y en colaboración con la industria farmacéutica Sanofi (Francia), el grupo se ha centrado en un modelo transgénico bigénico (PS1_{M146L} y APP_{751SL}) que sobreexpresa las formas mutadas de dos proteínas implicadas en el desarrollo del Alzheimer familiar. Estos doble transgénicos presentan acumulación extracelular de péptidos amiloides, muerte neuronal selectiva (interneuronas GABAérgicas), una marcada patología axonal/sináptica y un proceso neuroinflamatorio con activación microglial y astrogial, desde edades muy tempranas (4-6 meses de edad) en el hipocampo y la corteza entorrinal (Blanchard y col., 2003; Ramos y col., 2006; Caballero y col., 2007; Jiménez y col., 2008; Moreno-González y col., 2009; Baglietto-Vargas y col., 2010; Jiménez y col., 2011; Sánchez-Varo y col., 2012). Por tanto, este modelo PS1/APP recapitula parte de la patología observada en los pacientes, aunque aún es necesario validar el proceso neurodegenerativo en otras regiones cerebrales y determinar la vulnerabilidad de poblaciones neuronales altamente comprometidas en los pacientes como son las colinérgicas del telencéfalo basal.

Por otro lado, el continuo fracaso de los ensayos clínicos, la mayoría basados en la hipótesis de la cascada amiloide (inmunoterapias), hace necesario buscar nuevos enfoques terapéuticos que modifiquen el curso de la enfermedad y mejore los síntomas en los pacientes aumentando su calidad de vida. En este sentido, sería interesante evaluar a nivel preclínico en modelos animales de gran valor predictivo, el efecto neuroprotector de nuevas terapias no centradas en la eliminación/degradación de péptidos Abeta.

Por ello, y teniendo en cuenta los antecedentes anteriormente expuestos, el objetivo principal del presente estudio consiste en *profundizar en la caracterización neuropatológica de modelos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer y su uso en la evaluación preclínica de potenciales estrategias terapéuticas para la enfermedad*. Para ello, hemos planteado los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1. *Caracterizar el proceso neurodegenerativo que tiene lugar en 1) la región hipocampal del subículo y 2) en los grupos neuronales colinérgicos del telencéfalo basal.* El subículo se analizará en el modelo PS1_{M146L}/APP_{751SL} empleando fundamentalmente técnicas inmunohistoquímicas y estudios cuantitativos mediante análisis de imagen y estereología. Se estudiará la expresión extracelular e intracelular del A β , la vulnerabilidad de diferentes poblaciones neuronales y la patología axonal. Además, se estudiará la afectación colinérgica en diferentes modelos transgénicos (PS1/APP, APP, PS1 y TAU) de la enfermedad de Alzheimer principalmente mediante técnicas inmunohistoquímicas y estereología.

Objetivo 2. Estudiar el efecto sobre la progresión de la patología de potenciales estrategias neuroprotectoras en modelos transgénicos de la EA. Mediante técnicas celulares y moleculares, junto con estudios cognitivos, se determinará el posible efecto neuroprotector del tratamiento oral crónico con carbonato de litio, así como del compuesto NST0037 (estatina no comercial), en modelos transgénicos PS1/APP de esta enfermedad.

Objetivo 3. Analizar el efecto de la deficiencia de la interleuquina antiinflamatoria IL-4 sobre la progresión de la patología en un modelo transgénico de la EA. Con idea de evaluar el impacto del sistema inmune innato en la progresión de la patología y la posible modulación de dicho sistema como futura estrategia terapéutica, en este objetivo nos centraremos en el papel de la interleuquina antiinflamatoria IL-4 en la patología de la EA. Para llevar a cabo este objetivo se eliminará genéticamente la expresión del gen *IL-4* en el modelo transgénico APP mediante cruce con un ratón *IL4 KO* (Jackson Lab). El hipocampo del nuevo modelo generado APP/*IL4*^{-/-} será analizado mediante técnicas moleculares e inmunohistoquímicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abramov E, Dolev I, Fogel H, Ciccotosto GD, Ruff E, Slutsky I.** (2009). Amyloid- β as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nat Neurosci.*, 12(12):1567-1576.
- Aisen PS, Gauthier S, Ferris SH, Saugier D, Haine D, Garceau D, Duong A, Suhy J, Oh J, Lau WC, Sampalis J.** (2011). Tramiprosate in mild-to-moderate Alzheimer's disease - a randomized, double-blind, placebo-controlled, multi-centre study (the Alphase Study). *Arch Med Sci.*, 7(1):102-111.
- Aletrino MA, Vogels OJ, Van Domburg PH, Ten Donkelaar HJ.** (1992). Cell loss in the nucleus raphes dorsalis in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 13:461-468.
- Alexander AG, Marfil V, Li C.** (2014). Use of *Caenorhabditis elegans* as a model to study Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Front Genet.*, 5:279.
- Allen B, Ingram E, Takao M, Smith MJ, Jakes R, Virdee K, Yoshida H, Holzer M, Craxton M, Emson PC, Atzori C, Migheli A, Crowther RA, Ghetti B, Spillantini MG, Goedert M.** (2002). Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *J Neurosci.*, 22(21):9340-9351.
- Alvarez XA, Cacabelos R, Sampedro C, Alexandre M, Linares C, Granizo E, Doppler E, Moessler H.** (2011). Efficacy and safety of Cerebrolysin in moderate to moderately severe Alzheimer's disease: Results of a randomized, double-blind, controlled trial investigating three dosages of Cerebrolysin. *Eur J Neurol.*, 18:59-68.
- Alzheimer A.** (1907). Uber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgem Z Psychiatr-Gerich Med*, 64:146-148.
- Andorfer C, Kress Y, Espinoza M, de Silva R, Tucker KL, Barde YA, Duff K, Davies P.** (2003). Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *J Neurochem.*, 86(3):582-590.
- Armstrong RA.** (2006). Plaques and tangles and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol.*, 44(1):1-11.
- Ashe KH, Zahs KR.** (2010). Probing the biology of Alzheimer's disease in mice. *Neuron*, 66:631-645.
- Asuni AA, Boutajangout A, Quartermain D, Sigurdsson EM.** (2007). Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements. *J Neurosci.*, 27:9115-9129.
- Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuete M, Vitorica J, Gutierrez A.** (2010). Calretinin interneurons are early targets of extracellular amyloid-beta pathology in PS1/APP Alzheimer mice hippocampus. *J Alzheimers Dis.*, 21(1):119-132.

- Bagyinszky E, Youn YC, An SS, Kim S.** (2014). The genetics of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging*, 9:535-551.
- Bales KR, Verina T, Dodel RC, Du Y, Altstiel L, Bender M, Hyslop P, Johnstone EM, Little SP, Cummins DJ, Piccardo P, Ghetti B, Paul SM.** (1997). Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. *Nat Genet.*, 17(3):263-264.
- Bales KR, Verina T, Cummins DJ, Du Y, Dodel RC, Saura J, Fishman CE, DeLong CA, Piccardo P, Petegnief V, Ghetti B, Paul SM.** (1999). Apolipoprotein E is essential for amyloid deposition in the APP(V717F) transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(26):15233-15238.
- Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E.** (2011). Alzheimer's disease. *Lancet*, 377(9770):1019-1031.
- Baron R, Babcock AA, Nemirovsky A, Finsen B, Monsonego A.** (2014). Accelerated microglial pathology is associated with Ab plaques in mouse models of Alzheimer's disease. *Aging Cell*, 13:584-595.
- Barone E, Di Domenico F, Butterfield DA.** (2014). Statins more than cholesterol lowering agents in Alzheimer disease: Their pleiotropic functions as potential therapeutics targets. *Biochem Pharmacol.*, 88:605-616.
- Bartus RT, Dean RL 3rd, Beer B, Lippa AS.** (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*, 217(4558):408-414.
- Bartus RT.** (2000). On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp Neurol.*, 163(2):495-529.
- Bateman RJ, Siemers ER, Mawuenyega KG, Wen G, Browning KR, Sigurdson WC, Yarasheski KE, Friedrich SW, Demattos RB, May PC, Paul SM, Holtzman DM.** (2009). A gamma-secretase inhibitor decreases amyloid-beta production in the central nervous system. *Ann Neurol.*, 66(1):48-54.
- Baum LW.** (2005). Sex, hormones, and Alzheimer's disease. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.*, 60(6):736-743.
- Bayer TA, Wirths O.** (2008). Alzheimer's disease: Molecular pathology, animal models, and current treatment. *Nervenarzt.*, 79 Suppl 3:117-125.
- Bayer TA, Wirths O.** (2010). Intracellular accumulation of amyloid-beta –a predictor for synaptic dysfunction and neuron loss in Alzheimer's disease. *FNAGI*, 2(8):1-10.
- Beckmann N, Schuler A, Mueggler T, Meyer EP, Wiederhold KH, Staufenbiel M, Krucher T.** (2003). Age-dependent cerebrovascular abnormalities and blood flow disturbances in APP23 mice modeling Alzheimer's disease. *J Neurosci.*, 23(24):8453-8459.
- Benilova I, Karran E, De Strooper B.** (2012). The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci.*, 15(3):349-357.
- Bi X, Gall CM, Zhou J, Lynch G.** (2002). Uptake and pathogenic effects of amyloid β peptide 1-42 are enhanced by integrin antagonists and blocked by NMDA receptor antagonists. *Neuroscience*, 112:827-840.
- Bigl V, Schliebs R.** (1998). Simulation of cortical cholinergic deficits--a novel experimental approach to study pathogenetic aspects of Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl.*, 54:237-247.
- Bilkei-Gorzo A.** (2014). Genetic mouse models of brain ageing and Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther.*, 142(2):244-257.
- Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM.** (2005). Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron*, 45(5):675-688.
- Birch AM, Katsouri L, Sastre M.** (2014). Modulation of inflammation in transgenic models of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*, 11:25.
- Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, Planche M, Canton T, Jedidi I, Gohin M, Wirths O, Bayer TA, Langui D, Duyckaerts C, Tremp G, Pradier L.** (2003). Time sequence of maturation of dystrophic neuritis associated with Abeta deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp Neurol.*, 184(1):247-263.
- Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H.** (2006). Alzheimer's disease. *Seminars*, 368:387-403.
- Blurton-Jones M, LaFerla F.** (2006). Pathways by which A β facilitates tau pathology. *Curr Alzheimer Res.*, 3:437-448.
- Boggs LN, Fuson KS, Baez M, Churgay L, McClure D, Becker G, May PC.** (1996). Clusterin (Apo J) protects against in vitro amyloid-beta (1-40) neurotoxicity. *J Neurochem.*, 67(3):1324-1327.
- Bolmont T, Haass F, Eicke D, Radde R, Mathis C, Klunk WE, Kohsaka S, Jucker M, Calhoun ME.** (2008). Dynamics of the microglial/amyloid interaction indicate a role in plaque maintenance. *J Neurosci.*, 28(16):4283-4292.
- Bondolfi L, Calhoun M, Ermini F, Kuhn HG, Wiederhold KH, Walker L, Staufenbiel M, Jucker M.** (2002). Amyloid associated neuron loss and gliogenesis in the neocortex of amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci.*, 22(2):515-522.
- Borchelt DR, Thinakara G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada CM, Kim G, Seekins S, Yager D, Slunt HH, Wang R, Seeger M, Levev AI, Gandy SE, Copeland NG, Jenkins NA, Price DL, Younkin SG,**

- Sisodia SS.** (1996). Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron*, 17(5):1005-1013.
- Borchelt DR, Ratovitski T, van Lare J, Lee MK, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Price DL, Sisodia SS.** (1997). Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron*, 19(4):393-345.
- Bornemann KD, Wiederhold KH, Pauli C, Ermini F, Stalder M, Schnell L, Sommer B, Jucker M, Staufenbiel M.** (2001). Abeta-induced inflammatory processes in microglia cells of APP23 transgenic mice. *Am J Pathol.*, 158(1):63-73.
- Boutajangout A, Authelet M, Blanchard V, Touchet N, Tremp G, Pradier L, Brion JP.** (2004). Characterisation of cytoskeletal abnormalities in mice transgenic wild-type human tau and familial Alzheimer's disease mutants of APP and presenilin-1. *Neurobiol Dis.*, 15(19):47-60.
- Braak H, Braak E.** (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.*, 82(4):239-259.
- Bruce-Keller AJ, Gupta S, Knight AG, Beckett TL, McMullen JM, Davis PR, Murphy MP, Van Eldik LJ, St Clair D, Keller JN.** (2011). Cognitive impairment in humanized APPxPS1 mice is linked to A β (1-42) and NOX activation. *Neurobiol Dis.*, 44(3):317-326.
- Brunden KR, Zhang B, Carroll J, Yao Y, Potuzak JS, Hogan AM, Iba M, James MJ, Xie SX, Ballatore C, Smith AB 3rd, Lee VM, Trojanowski JQ.** (2010). Epothilone D improves microtubule density, axonal integrity, and cognition in a transgenic mouse model of tauopathy. *J Neurosci.*, 30:13861-13866.
- Busch C, Bohl J, Ohm TG.** (1997). Spatial, temporal and numeric analysis of Alzheimer changes in the nucleus coeruleus. *Neurobiol Aging*, 18:401-416.
- Butovsky O, Koronyo-Hamaoui M, Kunis G, Ophir E, Landa G, Cohen H, Schwartz M.** (2006). Glatiramer acetate fights against Alzheimer's disease by inducing dendritic-like microglia expressing insulin-like growth factor 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(31):11784-11789.
- Caccamo A, Majumder S, Richardson A, Strong R, Oddo S.** (2010). Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid-beta, and Tau: effects on cognitive impairments. *J Biol Chem.*, 285:13107-13120.
- Calero M, Gómez-Ramos A, Calero O, Soriano E, Avila J, Medina M.** (2015). Additional mechanisms conferring genetic susceptibility to Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci.*, 9:138.
- Cantarella G, Di Benedetto G, Puzzo D, Privitera L, Loreto C, Saccone S, Giunta S, Palmeri A, Bernardini R.** (2015). Neutralization of TNFSF10 ameliorates functional outcome in a murine model of Alzheimer's disease. *Brain*, 138(Pt 1):203-216.
- Casas C, Sergeant N, Itier JM, Blanchard V, Wirths O, Van der Kolk N, Vingtdeux V, Van de Steeg E, Ret G, Canton T, Drobecq H, Clark A, Bonici B, Delacouete A, Benavides J, Schmitz C, Tremp G, Bayer TA, Benoit P, Pradier L.** (2004). Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *Am J Pathol.*, 165(4):1289-1300.
- Chavez-Gutiérrez L, Bammens L, Benilova I, Vandersteen A, Benurwar M, Borgers M, Lismont S, Zhou L, Van Cleynenbreugel S, Esselmann H, Wiltfang J, Serneels L, Karran E, Gijzen H, Schymkowitz J, Rousseau F, Broersen K, De Strooper B.** (2012). The mechanism of γ -Secretase dysfunction in familial Alzheimer disease. *EMBO J.*, 31(10):22261-22274.
- Chen G, Chen KS, Knox J, Inglis J, Bernard A, Martin SJ, Justice A, McConlogue L, Games D, Freedman SB, Morris RG.** (2000). A learning deficit related to age and beta-amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature*, 408(6815):975-979.
- Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK.** (2014). Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation.*, 11:98.
- Chiang K, Koo ED.** (2014). Emerging therapeutics for Alzheimer's Disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 54:381-405.
- Chishti MA, Yang DS, Janus C, Phinney AL, Horne P, Pearson J, Strome R, Zuker N, Loukides J, French J, Turner S, Lozza G, Grilli M, Kunicki S, Morissette C, Paquette J, Gervais F, Bergeron C, Fraser PE, Carlson GA, Goerge-Hyslop PS, Westaway.** (2001). Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant of amyloid precursor protein 695. *J Biol Chem.*, 276(24):21562-21570.
- Cho SH, Sun B, Zhou Y, Kauppinen TM, Halabisky B, Wes P, Ransohoff RM, Gan L.** (2011). CX3CR1 protein signaling modulates microglial activation and protects against plaque-independent cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem.*, 286(37):32713-32722.
- Choi SH, Aid S, Caracciolo L, Minami SS, Niikura T, Matsuoka Y, Turner RS, Mattson MP, Bosetti F.** (2013). Cyclooxygenase-1 inhibition reduces amyloid pathology and improves memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurochem.*, 124(1):59-98.

- Choi SS, Lee SR, Kim SU, Lee HJ.** (2014). Alzheimer's disease and stem cell therapy. *Exp Neurol.*, 23(1):45-52.
- Christensen DZ, Kraus SL, Flohr A, Cotel MC, Wirths O, Bayer TA.** (2008). Transient intraneuronal A β rather than extracellular plaque pathology correlates with neuron loss in the frontal cortex of APP/PS1KI mice. *Acta Neuropathol.*, 116(6):647-655.
- Chui DH, Tanahashi H, Ozawa K, Ikeda S, Checler F, Ueda O, Suzuki H, Araki W, Inoue H, Shirotani K, Takahashi K, Gallyas F, Tabira T.** (1999). Transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. *Nat Med.*, 5(5):560-564.
- Citron M, Westaway D, Xia W, Carlson G, Diehl T, Levesque G, Johnson-Wood K, Lee M, Seubert P, Davis A, Kholodenko D, Motter R, Sherrington R, Perry B, Yao H, Strome R, Lieberburg I, Rommens J, Kim S, Schenk D, Fraser P, St George Hyslop P, Selkoe DJ.** (1997). Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med.*, 3(1):67-72.
- Claeyen S, Cochet M, Donneger R, Dumuis A, Blockaert J, Giannoni P.** (2012). Alzheimer culprits: cellular crossroads and interplay. *Cell Signal.*, 24(9):1831-1840.
- Cohen RM, Rezaei-Zadeh K, Weitz TM, Rentsendorj A, Gate D, Spivak I, Bholat Y, Vasilevko V, Glabe CG, Breunig JJ, Rakic P, Davtyan H, Agadjanyan MG, Kepe V, Barrio JR, Bannykh S, Szekely CA, Pechnick RN, Town T.** (2013). A transgenic Alzheimer rat with plaques, tau pathology, behavioral impairment, oligomeric A β , and frank neuronal loss. *J Neurosci.*, 33(15):6245-6256.
- Cohen SIA, Arosio P, Presto J, Kurudenkandy FR, Biverstal H, Dolfe L, Dunning C, Yang X, Frohm B, Vendruscolo M, Johansson J, Dobson CM, Fisahn A, Knowles TPJ, Linse S.** (2015). A molecular chaperone breaks the catalytic cycle that generates toxic A β oligomers. *Nat Struct Mol Biol.*, Epub ahead of print.
- Colonna M.** (2003). TREMs in the immune system and beyond. *Nat Rev Immunol.*, 3(6):445-453.
- Colton CA, Mott RT, Sharpe H, Xu Q, Van Nostrand WE, Vitek MP.** (2006). Expression profiles for macrophage alternative activation genes in AD and in mouse models of AD. *J Neuroinflammation*, 3(27):1-12.
- Condello C, Yuan P, Schain A, Grutzendler J.** (2015). Microglia constitute a barrier that prevents neurotoxic protofibrillar Ab42 hotspots around plaques. *Nat Commun.*, 6:6176.
- Congdon EE, Wu JW, Myeku N, Figueroa YH, Herman M, Marinec PS, Gestwicki JE, Dickey CA, Yu WH, Duff KE.** (2012). Methylthioninium chloride (methylene blue) induces autophagy and attenuates tauopathy in vitro and in vivo. *Autophagy*, 8(4):609-622.
- Cordeiro Q, Noguti R, Bottino CMC, Vallada H.** (2010). Study of association between genetic polymorphisms of phospholipase A2 enzymes and Alzheimer's disease. *Arq Neuropsiquiatr.*, 68(2):189-193.
- Coyle JT, Price DL, DeLong MR.** (1983). Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*, 219 (4589): 1184-1190.
- Craig LA, Hong NS, McDonald RJ.** (2011). Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neurosci Biobehav Rev.*, 35:1397-1409.
- Crews L, Masliah E.** (2010). Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.*, 19(R1):R12-20.
- Crowther DC, Kinghorn KJ, Page R, Lomas DA.** (2004). Therapeutic targets from a Drosophila model of Alzheimer's disease. *Curr Opin Pharmacol.*, 4:513-516.
- Cruchaga C, Karch CM, Jin SC, Benitez BA, Cai Y, Guerreiro R, Harari O, Norton J, Budde J, Bertelsen S, Jeng AT, Cooper B, Skorupa T, Carrell D, Levitch D, Hsu S, Choi J, et al.** (2014). Rare coding variants in the phospholipase D3 gene confer risk for Alzheimer's disease. *Nature*, 505(7484):550-554.
- Cummings BJ, Head E, Ruehl W, Milgram NW, Cotman CW.** (1996). The canine as an animal model of human aging and dementia. *Neurobiol Aging*, 17, 259-268.
- DaRocha-Souto B, Scotton TC, Coma M, Serrano-Pozo A, Hashimoto T, Serenó L, Rodríguez M, Sánchez B, Hyman BT, Gómez-Isla T.** (2011). Brain oligomeric β -amyloid but not total amyloid plaque burden correlates with neuronal loss and astrocyte inflammatory response in amyloid precursor protein/tau transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 70(5):360-376.
- Davies CA, Mann DM, Sumpter PQ and Yates PO.** (1987). A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.*, 78(2):151-164.
- De la Torre JC.** (2011). Three postulates to help identify the cause of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.*, 24(4):657-668.
- Deschaintre Y, Richard F, Leys D, Pasquier F.** (2009). Treatment of vascular risk factors is associated with slower decline in Alzheimer disease. *Neurology*, 73(9):674-680.
- De Strooper B.** (2010). Proteases and proteolysis in Alzheimer Disease: A multifactorial view on the disease process. *Physiol Rev.*, 90:465-494.
- Devi L, Ohno M.** (2010). Genetic reductions of beta-site amyloid precursor protein-cleaving

- enzyme 1 and amyloid-beta ameliorate impairment of conditioned taste aversion memory in 5XFAD Alzheimer's disease model mice. *Eur J Neurosci.*, 31:110–118.
- Dewachter I, Ris L, Croes S, Borghgraef P, Devijer H, Voets T, Nilius B, Godaux E, Van Leuven F.** (2008). Modulation of synaptic plasticity and Tau phosphorylation by wild-type and mutant presenilin1. *Neurobiol Aging*, 26:639-652.
- Dickson DW.** (1997). The pathogenesis of senile plaques. *JNeuropathol Exp Neurol.*,56(4):321-339.
- Dineley KT, Xia X, Bui D, Sweatt JD, Zheng H.** (2002). Accelerated plaque accumulation, associative learning deficits, and up-regulation of alpha 7 nicotinic receptor protein in transgenic mice co-expressing mutant human presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *J Biol Chem.*, 277:22768–22780.
- Do Carmo S, Cuello C.** (2013). Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats. *Mol Neurodegener.*, 8:37.
- Dolan PJ, Johnson GV.** (2010). The role of tau kinases in Alzheimer's disease. *Curr Opin Drug Discov Devel.*, 13(5):595-603.
- Doody RS, Raman R, Farlow M, Iwatsubo T, Vellas B, Joffe S, Kieburtz K, He F, Sun X, Thomas RG, Aisen PS; Alzheimer's Disease Cooperative Study Steering Committee, Siemers E, Sethuraman G, Mohs R, Semagacestat Study Group.** (2013). A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease. *N Engl J Med.*, 369(4):341-350.
- Doody RS, Thomas RG, Farlow M, Iwatsubo T, Vellas B, Joffe S, Kieburtz K, Raman R, Sun X, Aisen PS, Siemers E, Liu-Seifert H, Mohs R; Alzheimer's Disease Cooperative Study Steering Committee; Solanezumab Study Group.** (2014). Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med.*, 370(4):311-321.
- Du J, Liang Y, Xu F, Sun B, Wang Z.** (2013). Trehalose rescues Alzheimer's disease phenotypes in APP/PS1 transgenic mice. *J Pharm Pharmacol.*, 65:1753-1756.
- Duff K, Knight H, Refolo L, Sanders S, Yu X, Picciano M, Malester B, Hutton M, Adamson J, Goedert M, Burki K, Davies P.** (2000). Characterization of pathology in transgenic mice over-expressing human genomic and cDNA tau transgenes. *Neurobiol Dis.*, 7(2):87-98.
- Duyckaerts C, Potier MC, Delatour B.** (2008). Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol.*, 115(1):5-38.
- Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC.** (2009). Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol.*, 118:5-36.
- Edison P, Archer HA, Gerhard A, Hinz R, Pavese N, Turkheimer FE, Hammers A, Tai YF, Fox N, Kennedy A, Rossor M, Brooks DJ.** (2008). Microglia, amyloid, and cognition in Alzheimer's disease: An [11C](R)PK11195-PET and [11C]PIB-PET study. *Neurobiol Dis.*, 32(3):412-419.
- Elder GA, Gama Sosa MA, De Gasperi R, Dickstein DL, Hof PR.** (2010a). Presenilin transgenic mice as models of Alzheimer's disease. *Brain Struct Funct.*, 214:127-143.
- Elder GA, Gama Sosa MA, De Gasperi R.** (2010b). Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med.*, 77:69-81.
- El Khoury J, Toft M, Hickman SE, Means TK, Terada K, Geula C, Luster AD.** (2007). Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat Med.*, 13(4):432-438.
- Epis R, Gardoni R, Marcello E, Genazzani A, Canonico PL, Di Luca M.** (2010). Searching for new animal models of Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol.*, 626(1):57-63.
- Eskildsen SF, Coupé P, Fonov VS, Pruessner JC, Collins DL; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative.** (2015). Structural imaging biomarkers of Alzheimer's disease: predicting disease progression. *Neurobiol Aging*, 36 Suppl 1:S23-31.
- Evin G, Weidemann A.** (2002). Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Aβ amyloid peptides. *Peptides*, 23(7):1285-1297.
- Farris W, Schütz SG, Cirrito JR, Shankar GM, Sun X, George A, Leissring MA, Walsh DM, Qiu WQ, Holtzman DM, Selkoe DJ.** (2007). Loss of neprilysin function promotes amyloid plaque formation and causes cerebral amyloid angiopathy. *The American Journal of Pathology*, *Am J Pathol.*, 171(1):241-251.
- Flachsbart F, Cliebe A, Nothnagel M, Kleindorp R, Nikolaus S, Schreiber S, Nebel A.** (2010). Depletion of potential A2M risk haplotype for Alzheimer's disease in long-lived individuals. *Eur J Hum Genet.*, 28:59-61.
- Fleisher AS, Chen K, Quiroz YT, Jakimovich LJ, Gomez MG, Langois CM, Langbaum JB, Ayutyanont N, Roontiva A, Thiyyagura P, Lee W, Mo H, Lopez L, Moreno S, Acosta-Baena N, Giraldo M, et al.** (2012). Florbetapir PET analysis of amyloid-β deposition in the presenilin 1 E280A autosomal dominant Alzheimer's disease kindred: a cross-sectional study. *Lancet Neurol.*, 11(12):1057-1065.
- Flood DG, Reaume AG, Dorfman KS, Lin YG, Lang DM, Trusko SP, Savage MJ, Annaert WG, De Strooper B, Siman R, Scott RW.** (2002). FAD mutant PS-1 gene-targeted mice: increased Aβ42 and Aβ deposition without APP overproduction. *Neurobiol Aging*, 23(3):335-348.

- Flood DG, Lin YG, Lang DM, Trusko SP, Hirsch JD, Savage MJ, Scott RW, Howland DS.** (2009). A transgenic rat model of Alzheimer's disease with extracellular Abeta deposition. *Neurobiol Aging*, 30(7):1078-1090.
- Franco R, Cedazo-Minguez A.** (2014). Successful therapies for Alzheimer's disease: why so many in animal models and none in humans? *Front Pharmacol*, 5:146.
- Frautschy SA, Cole GM, Baird A.** (1992). Phagocytosis and deposition of vascular beta-amyloid in rat brains injected with Alzheimer beta-amyloid. *Am J Pathol.*, 140(6):1389-1399.
- Friedman LG, Qureshi YH, Yu WH.** (2015). Promoting autophagic clearance: viable therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, 12:94-108.
- Fu W, Jhamandas JH.** (2014). Role of astrocytic glycolytic metabolism in Alzheimer's disease pathogenesis. *Biogerontology*, 15(6):579-586.
- Fuhrmann M, Bittner T, Jung CKE, Burgold S, Page RM, Mitteregger G, Haass C, LaFerla FM, Krestschmar H, Herms J.** (2010). Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci.*, 13(4):411-413.
- Galasko D, Bennett D, Sano M, Ernesto C, Thomas R, Grundman M, Ferris S.** (1997). An inventory to assess activities of daily living for clinical trials in Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *Alzheimer Dis Assoc Disord.*, 11Suppl2:S33-39.
- Galea E, Launay N, Portero-Otin M, Ruiz M, Pamplona R, Aubourg P, Ferrer I, Pujol A.** (2012). Oxidative stress underlying axonal degeneration in adrenoleukodystrophy: a paradigm for multifactorial neurodegenerative diseases? *Biochim Biophys Acta*, 1822(9):1475-88.
- Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemmens J, Donaldson T, Gillespie F, Guido T, Hagopian S, Johnson-Wood K, Khan K, Lee M, Leibowitz P, Lieberburg I, Little S, Masliah E, McConlogue L, Montoya-Zavala M, Mucke L, et al.** (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature*, 373(6514):523-527.
- Gendron TF, Petrucelli L.** (2009). The role of tau in neurodegeneration. *Mol Neurodegener.*, 4:13.
- German DC, Manaye KF, White CL 3rd, Woodward DJ, McIntire DD, Smith WK, Kalaria RN, Mann DM.** (1992). Disease-specific patterns of locus coeruleus cell loss. *Ann Neurol.*, 32(5):667-676.
- Giannakopoulos P, Hof PR, Bouras C.** (1998). Selective vulnerability of neocortical association areas in Alzheimer's disease. *Microsc Res Tech.*, 43(1):16-23.
- Gies C, Lessick M.** (2009). Alzheimer disease in women: a clinical and genetics perspective. *Nurs Womens Health.*, 13(4):312-323; quiz 324.
- Girão da Cruz MT, Jordão J, Dasilva KA, Ayala-Grosso CA, Ypsilanti A, Weng YQ, Laferla FM, McLaurin J, Aubert I.** (2012). Early increases in soluble amyloid- β levels coincide with cholinergic degeneration in 3xTg-AD mice. *J Alzheimers Dis.*, 32(2):267-272.
- Giuffrida ML, Caraci F, Pignataro B, Cataldo S, De Bona P, Bruno V, Molinaro G, Pappalardo G, Messina A, Palmigiano A, Garozzo D, Nicoletti F, Rizzarelli E, Copani A.** (2009). Beta-amyloid monomers are neuroprotective. *J Neurosci.*, 29(34):10582-10587.
- Glass C, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH.** (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, 140(6):918-934.
- Goate A, Chartie-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Mant R, Newton P, Rooke K, Roques P, Talbot C, Pericak-Vance M, Roses A, Williamson R, Rossor M, Owen M, Hardy J.** (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 349(6311):704-706.
- Goldsbury C, Frey P, Olivieri V, Aebi U, Muller SA.** (2005). Multiple assembly pathways underlie amyloid- fibril polymorphisms. *J Mol Biol.*, 352:282-298.
- Gomez-Isla T, Price JL, McKeel DW Jr, Morris JC, Growdon JH, Hyman BT.** (1996). Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci.*, 16(14):4491-4500.
- Gomez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, Parisi JE, Hyman BT.** (1997). Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.*, 41(1):17.
- Gomez-Isla T, Spire T, De Calignon A, Hyman BT.** (2008). Neuropathology of Alzheimer's disease. *Handb Clin Neurol.*, 89:233-243.
- Gomez-Nicola D, Perry VH.** (2015). Microglial dynamics and role in the healthy and diseased brain: a paradigm of functional plasticity. *Neuroscientist*, 21(2):169-184.
- Götz J, Probst A, Spillantini MG, Schäfer T, Jakes R, Bürki K, Goedert M.** (1995). Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *EMBO J.*, 14(7):1304-1313.
- Götz J.** (2001). Tau and transgenic animal models. *Brain Res Rev.*, 35(3):266-286.
- Götz J, Chen F, Barmettler R, Nitsch RM.** (2001). Tau filament formation in transgenic mice

- expressing P301L tau. *J Biol Chem.*, 279(1):529-534.
- Gozes I, Stewart A, Morimoto B, Fox A, Sutherland K, Schmeche D.** (2009). Addressing Alzheimer's disease tangles: from NAP to AL-108. *Curr Alzheimer Res.*, 6:455-460.
- Green RC, Schneider LS, Amato DA, Beelen AP, Wilcock G, Swabb EA, Zavitz KH; Tarenflurbil Phase 3 Study Group.** (2009). Effect of tarenflurbil on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer disease: a randomized controlled trial. *JAMA*, 302(33):255-2564.
- Greenfield JP, Tsai J, Gouras GK, Hai B, Thinakaran G, Checler F, Sisodia SS, Greengard P, Xu H.** (1999). Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer beta-amyloid peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(2):742-747.
- Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, Carrasquillo M, Rogaeva E, Majouine E, Cruchaga C, Sassi C, Kauwe JS, Younkin S, Hazrati L, Collinge J, Pocock J, Lashley T, Williams J, Lambert JC, Amouyel P, Goate A, Rademakers R, Morgan K, Powell J, St George-Hyslop P, Singleton A, Hardy J.** (2013). TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N Engl J Med.*, 268:117-127.
- Haass C, Selkoe DJ.** (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 8(2):101-112.
- Hanyu H, Sato T, Kiuchi A, Sakurai H, Iwamoto T.** (2009). Pioglitazone improved cognition in a pilot study on patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment with diabetes mellitus. *J Am Geriatr Soc.*, 57:177-179.
- Hardy JA, Higgins GA.** (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256(5054):184-185.
- Hardy J.** (1997). Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.*, 20(4):154-159.
- Hardy J, Selkoe DJ.** (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297:353-356.
- Harold D, Abraham R, Hollingwoeth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvina V, Dowzell K, Williams A, Jones N, Thomas C, Stretton A, et al.** (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.*, 41(10):1088-1093.
- He P, Cheng X, Staufenbiel M, Li R, Shen Y.** (2013). Long-term treatment of thalidomide ameliorates amyloid-like pathology through inhibition of beta-secretase in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One*, 8:e55091.
- Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Hanke A, Dewachter I, Kuiperi C, O'Banion K, Klockgether T, Van Leuven F, Landreth GE.** (2005). Acute treatment with the PPARgamma agonist pioglitazone and ibuprofen reduces glial inflammation and Abeta1-42 levels in APPV717I transgenic mice. *Brain*, 128:1442-1453.
- Heneka MT, Ramanathan M, Jacobs AH, Dumitrescu-Ozimek L, Bilkei-Gorzo A, Debeir T, Sastre M, Galldiks N, Zimmer A, Hoehn M, Heiss WD, Klockgether T, Staufenbiel M.** (2006). Locus coeruleus degeneration promotes Alzheimer pathogenesis in amyloid precursor protein 23 transgenic mice. *J Neurosci.*, 26(5):1343-1354.
- Heneka MT, O'Banion MK.** (2007). Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol.*, 184(1-2):69-91.
- Heneka MT, Golenbock DT, Latz E.** (2015a). Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Immunol.*, 16(3):229-236.
- Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, Jacobs AH, Wyss-Coray T, Vitorica J, Ransohoff RM, Herrup K, Frautschy SA, Finsen B, Brown GC, Verkhratsky A, Yamanaka K, Koistinaho J, Latz E, Halle A, et al.** (2015b). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.*, 14(4):388-405.
- Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B.** (2015). Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci.*, 16(6):358-372.
- Herrup K.** (2015). The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat Neurosci.*, 18(6):794-799.
- Herzig MC, Winkler DT, Walker LC, Jucker M.** (2001). Transgenic mouse models of cerebral amyloid angiopathy. *Adv Exp Med Biol.*, 487:123-128.
- Hiltunen M, van Groen T, Jolkkonen J.** (2009). Functional roles of amyloid-beta protein precursor and amyloid-beta peptides: evidence from experimental studies. *J Alzheimers Dis.*, 18(2):401-412.
- Hirano A.** (1994). Hirano bodies and related neuronal inclusions. *Neuropathol Appl Neurobiol.*, 20(1):3-11.
- Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, Wright K, Saad I, Mueller R, Morgan D, Sanders S, Zehr C, O'Campo K, Hardy J, Prada CM, Eckman C, Younkin S, Hsiao K, Duff K.** (1998). Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med.*, 4(1):97-100.
- Howlett DR, Perry AE, Godfrey F, Swatton JE, Jennings KH, Spitzfaden C, Wadsworth H, Wood SJ, Markwell RE.** (1999). Inhibition of fibril formation in beta-amyloid peptide by a

- novel series of benzofurans. *Biochem J.*, 340(Pt 1):283-289.
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G.** (1996). Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*, 274(5284):99-102.
- Huang Y, Mucke L.** (2012). Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell*, 148:1204-1222.
- Hutton M, Hardy J.** (1997). The presenilins and Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.*, 6(10):1639-1646.
- Iadecola C.** (2004). Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.*, 5(5):347-360.
- Iqbal K, Grundke-Iqbal I.** (2008). Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, ethiopathogenesis, therapeutics and prevention. *J Cell Mol Med.*, 12(1):38-55.
- Iqbal K, Liu F, Gong CX.** (2014). Alzheimer disease therapeutics: Focus on the disease and not just plaques and tangles. *Biochem Pharmacol.*, 88:631-639.
- Irizarry MC, McNamara M, Fredorchank K, Hsiao K, Hyman BT.** (1997). APPsw transgenic mice develop age-related Ab deposits and neurotrophil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 56:965-973.
- Jankowsky JL, Slunt HH, Ratovitski T, Jenkins NA, Copeland NG, Borchelt DR.** (2001). Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomol Eng.*, 17:157-165.
- Jankowsky JK, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Lee MK, Younkin LH, Wagner SL, Younkin SG, Borchelt DR.** (2004). Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum Mol Genet.*, 13(2):159-170.
- Jankowsky JL, Slunt HH, Gonzales V, Savonenko AV, Wen JC, Jenkins NA, Copeland NG, Younkin LH, Lester HA, Younkin SG, Borchelt DR.** (2005). Persistent amyloidosis following suppression of A β production in a transgenic model of Alzheimer disease. *PLOS Med.*, 2(12):355.
- Jankowsky JL, Younkin LH, Gonzales V, Fadale DJ, Slunt HH, Lester HA, Younkin SG, Borchelt DR.** (2007). Rodent A β modulates the solubility and distribution of amyloid deposits in transgenic mice. *J Biol Chem.*, 282(31):22707-22720.
- Jiang ZJ, Richardson JS, Yu PH.** (2008). The contribution of cerebral vascular semicarbazide-sensitive amine oxidase to cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.*, 34(2):194-204.
- Jimenez S, Baglietto-Vargas D, Caballero C, Moreno-Gonzalez I, Torres M, Sanchez-Varo R, Ruano D, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J.** (2008). Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *J Neurosci.*, 28(45):11650-61.
- Johnstone M, Gearing AJ, Miller KM.** (1999). A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. *J Neuroimmunol.*, 93(1-2):182-193.
- Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson PV, Bjornsson S, Stefansson H, Sulem P, Gudbjartsson D, Maloney J, Hoyte K, Gustafson A, Liu Y, Lu Y, Bhangale T, Graham RR, et al.** (2012). A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*, 488(7409):96-99.
- Jonsson T, Stefansson H, Steinberg S, Jonsdottir I, Jonsson PV, Snaedal J, Bjornsson S, Huttenlocher J, Levey AI, Lah JJ, Rujescu D, Hampel H, Giegling I, Andreassen OA, Engedal K, Ulstein I, Djurovic S, Ibrahim-Verbaas C, Hofman A, Ikram MA, van Duijn CM, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K.** (2013). Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med.*, 368(2):107-116.
- Kalaria R.** (2002). Similarities between Alzheimer's disease and vascular dementia. *J Neurol Sci.*, 203-204:29-34.
- Kalinin S, Polak PE, Lin SX, Sakharkar AJ, Pandey SC, Feinstein DL.** (2012). The noradrenaline precursor L-DOPS reduces pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 33(8):1651-1663.
- Kang JE, Lim MM, Bateman RJ, Lee JJ, Smyth LP, Cirrito JR, Fujiki N, Nishino S, Holtzman DM.** (2009). Amyloid-beta dynamics are regulated by orexin and the sleep-wake cycle. *Science*, 326(5955):1005-1007.
- Karch CM, Cruchaga C, Goate AM.** (2014). Alzheimer's disease genetics: from the bench to the clinic. *Neuron*, 83(1):11-26.
- Karl T, Bhatia S, Cheng D, Kim WS, Garner B.** (2012). Cognitive phenotyping of amyloid precursor protein transgenic J20 mice. *Behav Brain Res.*, 228:392-397.
- Karran E, Mercken M, De Strooper B.** (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.*, 10(9):698-712.
- Karran E, Hardy J.** (2014). A critique of the drug discovery and phase 3 clinical programs targeting the amyloid hypothesis for Alzheimer Disease. *Ann Neurol.*, 76(2):185-205.

- Kausahl A, Wani WY, Anand R, Gill KD.** (2013). Spontaneous and induced nontransgenic animal model of AD: modeling AD using combinatorial approach. *Am J Alzheimer Dis Other Dement.*, 28(4):318-326.
- Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A.** (2013). Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron*, 77(1):10-8.
- Kim D, Tsai LH.** (2009). Bridging physiology and pathology in AD. *Cell*, 137:997-1000.
- Kim M, Suh J, Romano D, Truong MH, Mullin K, Hooli B, Norton D, Tesco G, Elliott K, Wagner SL, Moir RD, Becker KD, Tanzi RE.** (2009). Potential late-onset Alzheimer's disease-associated mutations in the ADAM10 gene attenuate α -secretase activity. *Hum Mol Genet.*, 18(20):3987-3996.
- Kimura T, Ishiguro K, Hisanaga S.** (2014). Physiological and pathological phosphorylation of tau by Cdk5. *Front Mol Neurosci.*, 7:65.
- Kobayashi K, Imagama S, Ohgomori T, Hirano K, Uchimura K, Sakamoto K, Hirakawa A, Takeuchi H, Suzumura A, Ishiguro N, Kadomatsu K.** (2013). Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death Dis.*, 4:e525.
- Kordower JH, Chu Y, Stebbins GT, DeKosky ST, Cochran EJ, Bennett D, Mufson EJ.** (2001). Loss and atrophy of layer II entorhinal cortex in elderly people with mild cognitive impairment. *Ann Neurol.*, 49(2):202-213.
- Kraft AW, Hu X, Yoon H, Yan P, Xiao Q, Wang Y, Gil SC, Brown J, Wilhelmsson U, Restivo JL, Cirrito JR, Holtzman DM, Kim J, Pekny M, Lee JM.** (2013). Attenuating astrocyte activation accelerates plaque pathogenesis in APP/PS1 mice. *FASEB J.*, 27(1):187-198.
- Kurt MA, Davies DC, Kidd M, Duff K, Howlett DR.** (2003). Hyperphosphorylated tau and paired helical filament-like structures in the brains of mice carrying mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin-1 transgenes. *Neurobiol Dis.*, 14(1):89-97.
- LaFerla FM, Green KN, Oddo S.** (2007). Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.*, 8:499-509.
- Lalonde R, Kim HD, Maxwell JA, Fukuchi K.** (2005). Exploratory activity and spatial learning in 12-month-old APP(695)SWE/co+PS1/DeltaE9 mice with amyloid plaques. *Neurosci Lett.*, 390(2):87-92.
- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL.** (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(11):6448-6453.
- Lambert JC, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, Combarros O, Zelenika D, Bullido M, Tavernier B, Letenneur L, Bettens K, et al.** (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.*, 41(10):1094-1099.
- Lannfelt L, Blennow K, Zetterberg H, Batsman S, Ames D, Harrison J, Masters CL, Targum S, Bush AI, Murdoch R, Wilson J, Ritchie CW; PBT2-201-EURO study group.** (2008). Safety, efficacy, and biomarker findings of PBT2 in targeting Abeta as a modifying therapy for Alzheimer's disease: a phase IIa, double-blind, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.*, 7(9):779-786.
- Lannfelt L, Möller C, Basun H, Osswald G, Sehlin D, Satlin A, Logovinsky V, Gellerfors P.** (2014). Perspectives on future Alzheimer therapies: amyloid- β protofibrils – a new target for immunotherapy with BAN2401 in Alzheimer's disease. *Alzheimer Res Ther.*, 6:16.
- Latta CH, Brothers HM, Wilcock DM.** (2014). Neuroinflammation in Alzheimer's disease; a source of heterogeneity and target for personalized therapy. *Neuroscience*, pii: S0306-4522(14)00820-3.
- Lauren J, Gimbel DA, Nygaard HB, Gilbert JW, Strittmatter SM.** (2009). Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature*, 457(7233):1128-1132.
- Lazarov O, Peterson LD, Peterson DA, Sisodia SS.** (2006). Expression of familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 variant enhances perforant pathway lesion-induced neuronal loss in the entorhinal cortex. *JNeurosci.*, 26(2):429-434.
- Lee VMY, Goedert M, Trojanowski Q.** (2001). Neurodegenerative tauopathies. *Ann Rev Neurosci.*, 24:1121-1159.
- Lee KW, Im JY, Song JS, Lee SH, Lee HJ, Ha HY, Koh JY, Gwag BJ, Yang SD, Paik SG, Han PL.** (2006). Progressive neuronal loss and behavioural impairments of transgenic C57BL/6 inbred mice expressing the carboxy terminus of amyloid precursor protein. *Neurobiol Dis.*, 22:10-24.
- Lee DCY, Landreth GE.** (2010). The role of microglia in amyloid clearance from AD brain. *J Neural Transm.*, 117:949-960.
- Lee JH, Yu Wh, Kumar A, Lee S, Mohan PS, Peterhoff CM, Wolfe DM, Martinez-Vicente M, Massey AC, Sovak G, Uchiyama Y, Westaway D, Cuervo AM, Nixon RA.** (2010). Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell*, 141:1146-1158.
- Lesné S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH.** (2006).

- A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*, 440(7082):284-285.
- Lewis J, McGowan E, Rockwood J, Melrose H, Nacharaju P, Van Slegtenhorst M, Gwinn-Hardy K, Paul Murphy M, Baker M, Yu X, Duff K, Hardy J, Corral A, Lin WL, Yen SH, Dickson DW, Davies P, Hutton M.** (2000). Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet.*, 25:402-405.
- Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, Eckman C, Hardy J, Hutton M, McGowan E.** (2001). Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science*, 293(5534):1487-1491.
- Li H, Wolfe MS, Selkoe DJ.** (2009a). Toward structural elucidation of the gamma-secretase complex. *Structure*, 17(3):326-334.
- Li M, Chen L, Hon Seng Lee D, Yu LC, Zhang Y.** (2009b). The role of intracellular amyloid β in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol.*, 83:131-139.
- Lichtenstein MP, Carriba P, Masgrau R, Pujol A, Galea E.** (2010). Staging anti-inflammatory therapy in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci.*, 25;2:142.
- Liu Z, Condello C, Schain A, Harb R, Grutzendler J.** (2010). CX3CR1 in microglia regulates brain amyloid deposition through selective protofibrillar amyloid- β phagocytosis. *J Neurosci.*, 30(50):17091-17101.
- Luchsinger JA, Mayeux R.** (2004). Dietary factors and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.*, 3(10):579-587.
- Lugaresi A, Di Iorio A, Iarlori C, Reale M, De Luca G, Sparvieri E, Michetti A, Conti P, Gambi D, Abate G, Paganelli R.** (2004). IL-4 in vitro production is upregulated in Alzheimer's disease patients treated with acetylcholinesterase inhibitors. *Exp Gerontol.*, 39:653-657.
- Malm TM, Koistinaho M, Parepalo M, Vatanen T, Ooka A, Karlsson S, Koistinaho J.** (2005). Bone-marrow-derived cells contribute to the recruitment of microglial cells in response to beta-amyloid deposition in APP/PS1 double transgenic Alzheimer mice. *Neurobiol Dis.*, 18(1):134-142.
- Manaye KF, Mouton PR, Xu G, Drew A, Lei DL, Sharma Y, Rebeck GW, Turner S.** (2013). Age-related loss of noradrenergic neurons in the brains of triple transgenic mice. *Age (Dordr.)*, 35(1):139-147.
- Mandrekar S, Jiang Q, Lee CY, Koenigsnecht-Talboo J, Holtzman DM, Landreth GE.** (2009). Microglia mediate the clearance of soluble Abeta through fluid phase macropinocytosis. *J Neurosci.*, 29(13):4252-4262.
- Mastrangelo MA, Bowers WJ.** (2008). Detailed immunohistochemical characterization of temporal and spatial progression of Alzheimer's disease-related pathologies in male triple-transgenic mice. *BMC Neurosci.*, 9:81.
- Matarin M, Salih DA, Yasvoina M, Cummings DM, Guelfi S, Liu W, Nahaboo Solim MA, Moens TG, Paublete RM, Ali SS, Perona M, Desai R, Smith KJ, Latcham J, Fulleylove M, Richardson JC, Hardy J, Edwards FA.** (2015). A Genome-wide Gene-Expression Analysis and Database in Transgenic Mice during Development of Amyloid or Tau Pathology. *Cell Rep.*, 10(4):633-644.
- McDonald RJ.** (2002). Multiple combinations of co-factors produce variants of age-related cognitive decline: a theory. *Can J Exp Psychol.*, 56(3):221-239.
- McDonald CR, Gharapetian L, McEvoy LK, Fennema-Notestine C, Hagler DJ Jr, Holland D, Dale AM, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative.** (2012). Relationship between regional atrophy rates and cognitive decline in mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*, 33:242-253.
- McGeer EG, McGeer PL.** (2010). Neuroinflammation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a field in its infancy. *J Alzheimers Dis.*, 19(1):355-361.
- McNaull BBA, Todd S, McGuinness B, Passmore AP.** (2010). Inflammation and Anti-Inflammatory strategies for Alzheimer's disease - A mini-review. *Gerontology*, 56:3-14.
- Medina M, Avila J.** (2014). New perspectives on the role of tau in Alzheimer's disease. Implications for therapy. *Biochem Pharmacol.*, 88(4):540-547.
- Mena MA, Garcia de Yebenes J.** (2008). Glial cells as players in parkinsonism: the "good," the "bad," and the "mysterious" glia. *The Neuroscientist*, 14(6):544-560.
- Menting KW, Claassen JA.** (2014). B-secretase inhibitor; a promising novel therapeutic drug in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci.*, 6:165.
- Meyer-Luehmann M, Spires-Jones TL, Prada C, Garcia-Alloza M, de Calignon A, Rozkalne A, Koenigsnecht-Talboo J, Holtzman DM, Bacskai BJ, Hyman BT.** (2008). Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature*, 451(7179):720-724.
- Miller G.** (2012). Alzheimer's research. Stopping Alzheimer's before it starts. *Science*, 337:790-792.
- Miners JS, Palmer JC, Tayler H, Palmer LE, Ashby E, Kehoe PG, Love S.** (2014). A β degradation or cerebral perfusion? Divergent effects of multifunctional enzymes. *Front Aging Neurosci.*, 6:238.

- Mizushima N, Komatsu M.** (2011). Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, 147(4):728-741.
- Mohs RC, Knopman D, Petersen RC, Ferris SH, Ernesto C, Grundman M, Sano M, Bieliauskas L, Geldmacher D, Clark C, Thal LJ.** (1997). Development of cognitive instruments for use in clinical trials of antidementia drugs: additions to the Alzheimer's Disease Assessment Scale that broaden its scope. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *Alzheimer Dis Assoc Disord.*, 11Suppl 2:S13-21.
- Moore S, Evans LD, Andersson T, Portelius E, Smith J, Dias TB, Saurat N, McGlade A, Kirwan P, Blennow K, Hardy J, Zetterberg H, Livesey FJ.** (2015). APP Metabolism Regulates Tau Proteostasis in Human Cerebral Cortex Neurons. *Cell Rep.*, 11(5):689-696.
- Morales I, Guzmán-Martínez L, Cerda-Troncoso C, Farías GA, Maccioni RB.** (2014). Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Front Cell Neurosci.*, 8:112.
- Moreau K, Renna M, Rubinsztein DC.** (2013). Connections between SNAREs and autophagy. *Trends Biochem Sci.*, 38(2):57-63.
- Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejías E, del Río JC, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuete M, Vitorica J, Gutiérrez A.** (2009). Extracellular Amyloid- β and cytotoxic glial activation induce significant entorhinal neuron loss in young PS1^{M146L}/APP^{751SL} mice. *J Alzheimers Dis.*, 18:755-776.
- Morishima-Kawashima M, Ihara Y.** (2002). Alzheimer's disease: β -Amyloid protein and tau. *J Neurosci Res.*, 70(3):392-401.
- Morley JE, Farr SA, Banks WA, Johnson SN, Yamada KA, Xu LA.** (2010). Physiological role for amyloid-beta protein: enhancement of learning and memory. *J Alzheimers Dis.*, 19(2):441-449.
- Morris JC.** (1993). The Clinical Dementia Rating (CDR): current version and scoring rules. *Neurology*, 43(11):2412-2414.
- Mosher KI, Wyss-Coray T.** (2014). Microglial dysfunction in brain aging and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol.*, 88:594-604.
- Mrak RE, Griffin ST.** (2005). Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiol Aging*, 26(3):349-354.
- Mucke L, Masliah M, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L.** (2000). High-level neuronal expression of A β 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci.*, 20(11):4050-4058.
- Mueller-Stainer S, Zhou Y, Arai H, Roberson ED, Sun B, Chen J, Wang X, Yu G, Esposito L, Mucke L, Gan L.** (2006). Anti-amyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications for Alzheimer's disease. *Neuron*, 51(6):703-714.
- Müller U, Winter P, Graeber MB.** (2013). A presenilin 1 mutation in the first case of Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.*, 12(2):129-130.
- Musiek ES, Holtzman DM.** (2015). Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and 'wingmen'. *Nat Neurosci.*, 18(6):800-806.
- Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, Tsukada S, Schroeder BE, Shaked GM, Wang L, Blesch A, Kim A, Conner JM, Rockenstein E, Chao MV, Koo EH, Geschwind D, Masliah E, Chiba AA, Tuszynski MH.** (2009). Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease. *Nat Med.*, 15:331-337.
- Nagele RG, D'Andrea MR, Lee H, Venkataraman V, Wang HY.** (2003). Astrocytes accumulate Abeta 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. *Brain Res.*, 971(2):197-209.
- Nakano Y, Kondoh G, Kudo T, Imaizumi K, Kato M, Miyazaki JI, Tohyama M, Takeda J, Takeda M.** (1999). Accumulation of murine amyloidbeta42 in a gene-dosage-dependent manner in PS1 'knock-in' mice. *Eur J Neurosci.*, 11(7):2577-2581.
- Nasrallah IM, Wolk DA.** (2014). Multimodality imaging of Alzheimer disease and other neurodegenerative dementias. *J Nucl Med.*, 55(12):2003-2011.
- Nedergaard M.** (2013). Garbage truck of the brain. *Science*, 340(6140):1529-1530.
- Neha, Sodhi RK, Jaggi AS, Singh N.** (2014). Animal models of dementia and cognitive dysfunction. *Life Sci.*, 109(2):73-86.
- Neugroschl J, Sano M.** (2010). Current treatment and recent clinical research in Alzheimer's disease. *Mt Siani J Med.*, 77:3-16.
- Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA.** (1986). Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res.*, 387(3):271-280.
- Newman M, Ebrahimie E, Lardelli M.** (2014). Using the zebrafish model for Alzheimer's disease research. *Front Genet.*, 5:189.
- Nixon RA.** (2007). Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J Cell Sci.*, 120:4081-4091.

- Nixon RA, Yang DS.** (2011). Autophagy failure in Alzheimer's disease-locating the primary defect. *Neurobiol Dis.*, 43(1):38-45.
- Noble W, Garwood C, Stephenson J, Kinsey AM, Hanger DP, Anderton BH.** (2009). Minocycline reduces the development of abnormal tau species in models of Alzheimer's disease. *FASEB J.*, 23:739-750.
- Noguchi A, Matsumura S, Dezawa M, Tada M, Yanazawa M, Ito A, Akioka M, Kikuchi S, Sato M, Ideno S, Noda M, Fukunari A, MURamatsu SI, Itokazu Y, Sato K, Takahashi H, Teplow DB, Nabeshima YI, Kakita A, Imahori K, Hoshi M.** (2009). Isolation and characterization of patient-derived, toxic, high mass amyloid beta protein assembly from Alzheimer disease brains. *J Biol Chem.*, 284:32895-32905.
- Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van Eldik L, Berry R, Vassar R.** (2006). Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci.*, 26(40):10129-10140.
- O'Brien RJ, Wong PC.** (2011). Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci.*, 34:185-204.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM.** (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39(3):409-421.
- Oddo S, Caccamo A, Cheng D, Juleh B, Torp R, LaFerla FM.** (2007). Genetically augmenting tau levels does not modulate the onset or progression of A β pathology in transgenic mice. *J Neurochem.*, 102(4):1053-1063.
- Ohno M, Chang L, Tseng W, Oakley H, Citron M, Klein WL, Vassar R, Disterhoft JF.** (2006). Temporal memory deficits in Alzheimer's mouse models: rescue by genetic deletion of BACE1. *Eur J Neurosci.*, 23(1):251-260.
- O'Neil JN, Mouton PR, Tizabi Y, Ottinger MA, Lei DL, Ingram DK, Manaye KF.** (2007). Catecholaminergic neuronal loss in locus coeruleus of aged female dtg APP/PS1 mice. *J Chem Neuroanat.*, 34(3-4):102-107.
- Overk CR, Masliah E.** (2014). Pathogenesis of synaptic degeneration in Alzheimer's disease and Lewy body disease. *Biochem Pharmacol.*, 88(4):508-516.
- Oyama F, Sawamura N, Kobayashi K, Morishima-Kawashima M, Kuramochi T, Ito M, Tomita T, Maruyama K, Saido TC, Iwatsubo T, Capell A, Walter J, Grünberg J, Ueyama Y, Haass C, Ihara Y.** (1998). Mutant presenilin 2 transgenic mouse: effect on an age-dependent increase of amyloid beta-protein 42 in the brain. *J Neurochem.*, 71(1):313-322.
- Padurariu M, Ciobica A, Lefter R, Serban IL, Stefanescu C, Chirita R.** (2013). The oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Psychiatr Danub.*, 25(4):401-409.
- Pákási M, Kálmán J.** (2008). Interactions between the amyloid and cholinergic mechanisms in Alzheimer's disease. *Neurochem Int.*, 53:103-111.
- Palop JJ, Mucke L.** (2010). Amyloid- β -induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neuronal networks. *Nat Neurosci.*, 13(7):812-818.
- Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR 3rd, Lafaille JJ, Hempstead BL, Littman DR, Gan WB.** (2013). Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell*, 155(7):1596-1609.
- Pasternak SH, Bagshaw RD, Guiral M, Zhang S, Ackerley CA, Pak BJ, Callahan JW, Mahuran DJ.** (2003). Presenilin-1, nicastrin, amyloid precursor protein, and gamma secretase activity are co-localized in the lysosomal membrane. *J Biol Chem.*, 278:26687-26694.
- Perez SE, He B, Muhammad N, Oh KJ, Fahnestock M, Ikonomic MD, Mufson EJ.** (2011). Cholinergic basal forebrain system alterations in 3xTg-AD transgenic mice. *Neurobiol Dis.*, 41(2):338-352.
- Perez-Nievas BG, Stein TD, Tai HC, Dols-Icardo O, Scotton TC, Barroeta-Espar I, Fernandez-Carballo L, de Munain EL, Perez J, Marquie M, Serrano-Pozo A, Frosch MP, Lowe V, Parisi JE, Petersen RC, Ikonomic MD, López OL, Klunk W, Hyman BT, Gómez-Isla T.** (2013). Dissecting phenotypic traits linked to human resilience to Alzheimer's pathology. *Brain*, 136(Pt 8):2510-2526.
- Perl DP.** (2010). Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med.*, 77:32-42
- Perry VH, Nicoll JAR, Holmes C.** (2010). Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol.*, 6:193-201.
- Persson T, Popescu BO, Cedazo-Minguez A.** (2014). Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. Why did antioxidant therapy fail? *Oxid Med Cell Longev.*, 2014:427318.
- Pertusa M, Garcia-Matas S, Rodriguez-Farre E, Sanfeliu C, Cristofol R.** (2007). Astrocytes aged in vitro show a decreased neuroprotective capacity. *J Neurochem.*, 101(3):794-805.
- Popović M, Caballero-Bleda M, Kadish I, Van Groen T.** (2008). Subfield and layer-specific depletion in calbindin-D28K, calretinin and parvalbumin immunoreactivity in the dentate gyrus of amyloid precursor protein/presenilin 1 transgenic mice. *Neuroscience*, 155(1):182-191.

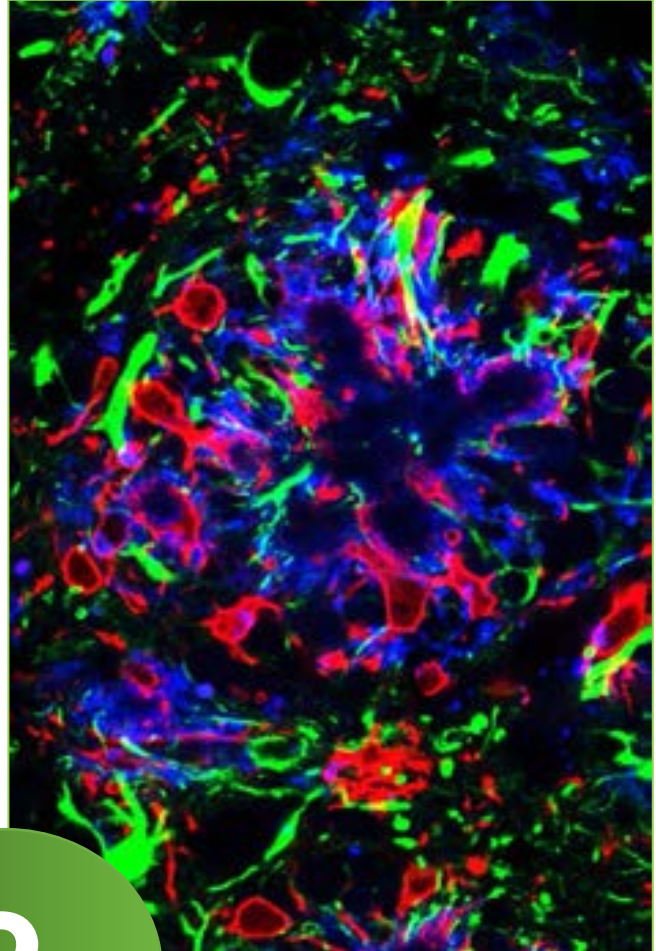
- Price JL, Ko AI, Wade MJ, Tsou SK, McKeel DW, Morris JC.** (2001). Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer disease. *Arch Neurol.*, 58(9):1395-1402.
- Priller C, Dewachter I, Vassallo N, Paluch S, Pace C, Kretschmar HA, Van Leuven F, Herms J.** (2007). Mutant presenilin 1 alters synaptic transmission in cultured hippocampal neurons. *J Biol Chem.*, 282(2):1119-1127.
- Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP.** (2013). The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement.*, 9(1):63-75.e2.
- Prut L, Abramowski D, Krucker T, Levy CL, Roberts AJ, Staufenbiel M; Wiessner C.** (2007). Aged APP23 mice show a delay in switching to the use of a strategy in the Barnes maze. *Behav Brain Res.*, 179(1):107-110.
- Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fà M, Staniszewski A, Palmeri A, Arancio O.** (2008). Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci.*, 28(53):14537-14545.
- Querfurth HW, LaFerla FM.** (2010). Alzheimer's disease. *N Engl J Med.*, 362(4):329-344.
- Rajendran L, Annaert W.** (2012). Membrane trafficking pathways in Alzheimer's Disease. *Traffic*, 13(6):759-770.
- Ramos B, Baglietto-Vargas D, del Río JC, Moreno-González I, Santa-María C, Jiménez S, Caballero C, Lopez-Tellez JF, Khan ZU, Ruano D, Gutierrez A, Vitorica J.** (2006). Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1xAPP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 27(11):1658-1672.
- Ramsden M, Kotilinek L, Forster C, Paulson J, McGowan E, SantaCruz K, Guimaraes A, Yue M, Lewis J, Carlson G, Hutton M, Ashe KH.** (2005). Age-dependent neurofibrillary tangle formation, neuron loss, and memory impairment in a mouse model of human tauopathy (P301L). *J Neurosci.*, 25(46):10637-47.
- Reiman EM, Caselli RJ.** (1999). Alzheimer's disease. *Maturitas*, 31(3):185-200.
- Reisberg B, Doody R, Stoffler A, Schmitt F, Ferris S, Mobius HJ, Memantine Study Group.** (2003). Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med.*, 348(14):1333-1341.
- Ribe EM, Perez M, Puig B, Gich I, Lim F, Cuadrado M, Sesma T, Catena S, Snachez B, Nieto M, Gomez-Ramos P, Moran MA, Cabodevilla F, Samaranch L, Ortiz L, Perez A, Ferrer I, Avila J, Gomez-Isla T.** (2005). Accelerated amyloid deposition, neurofibrillary degeneration and neuronal loss in double mutant APP/tau transgenic mice. *Neurobiol Dis.*, 20:814-822.
- Ricciarelli R, Canepa E, Marengo B, Marinari UM, Poli G, Pronzato MA, Domenicotti C.** (2012). Cholesterol and Alzheimer's disease: a still poorly understood correlation. *IUBMB Life*, 64:931-935.
- Rockenstein E, Adams A, Mante M, Larrea G, Crews L, Windisch M, Moessler H, Masliah E.** (2005). Amelioration of the cerebrovascular amyloidosis in a transgenic model of Alzheimer's disease with the neurotrophic compound cerebrolysin. *J Neural Transm.*, 112:269-282.
- Rockenstein E, Torrance M, Adame A, Mante M, Baron P, Rose JB, Crews L, Masliah.** (2007). Neuroprotective effects of regulators of the glycogen synthase kinase-3beta signalling pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease are associated with reduced amyloid precursor protein phosphorylation. *J Neurosci.*, 27:1981-1991.
- Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T, Mar L, Sorbi S, Nacmias B, Piacentini S, Amaducci L, Chumakov I, Cohen D, Lannfelt L, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH.** (1995). Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*, 376(6543):775-778.
- Rogaeva E, Meng Y, Lee JH, Gu Y, Kawarai T, Zou F, Katayama T, Baldwin CT, Cheng R, Hasegawa H, Chen F, Shibata N, Lunetta KL, Pardossi-Piquard R, Bohm C, Wakutani Y, Cupples LA, Cuenco KT, et al.** (2007). The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet.*, 39(2):168-177.
- Rosenmann H, Grigoriadis N, Eldar-Levy H, Avital A, Rozenstein L, Touloumi O, Behar L, Ben-Hur T, Avraham Y, Berry E, Segal M, Ginzburg I, Abramsky O.** (2008). A novel transgenic mouse expressing double mutant tau driven by its natural promoter exhibits tauopathy characteristics. *Exp Neurol.*, 212(1):71-84.
- Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerrière A, Vital A, Dumanchin C, Feuillet S, Brice A, Vercelletto M, Dubas F, Frebourg T, Campion D.** (2006). APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet.*, 38(1):24-26.
- Ruan L, Kang Z, Pei G, Le Y.** (2009). Amyloid deposition and inflammation in APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.*, 6:531-540.
- Rutten BP, Van der Kolk NM, Schafer S, van Zandvoort MA, Bayer TA, Steinbusch HW, Schmitz C.** (2005). Age-related loss of synaptophysin immunoreactive presynaptic

- boutons within the hippocampus of APP751SL, PS1M146L, and APP751SL/PS1M146L transgenic mice. *Am J Pathol.*, 167(1):161-173.
- Sakono M, Zako T.** (2010). Amyloid oligomers: formation and toxicity of A β oligomers. *FEBS Journal*, 277:1348-1358.
- Salloway S, Sperling R, Keren R, Porsteinsson AP, van Dyck CH, Tariot PN, Gilman S, Arnold D, Abushakra S, Hernandez C, Crans G, Liang E, Quinn G, Bairu M, Pastrak A, Cedarbaum JM; ELND005-AD201 Investigators.** (2011). A phase 2 randomized trial of ELND005, scyllo-inositol, in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology*, 77(13):1253-1262.
- Salloway S, Sperling R, Fox NC, Blennow K, Klunk W, Raskind M, Sabbagh M, Honig LS, Porsteinsson AP, Ferris S, Reichert M, Ketter N, Nejadnik B, Guenzler V, Miloslavsky M, Wang D, Lu Y, Lull J, Tudor IC, Liu E, Grundman M, Yuen E, Black R, Brashear HR; Bapineuzumab 301 and 302 Clinical Trial Investigators.** (2014). Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer disease. *N Engl J Med.*, 370(4):322-333.
- Sanchez-Ferro A, Benito-Leon J, Mitchell AJ, Bermejo-Pareja F.** (2013). A review of the potential therapeutic role of statins in the treatment of Alzheimer's disease: current research and opinion. *Neuropsych Dis Treat.*, 9:55-63.
- SantaCruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowki M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH.** (2005). Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science*, 309(5733):476-481.
- Sastre M, Dewachter I, Landreth GE, Willson TM, Klockgether T, van Leuven F, Heneka MT.** (2003). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists modulate immunostimulated processing of amyloid precursor protein through regulation of beta-secretase. *J Neurosci.*, 23:9796-9804.
- Sastre M, Gentleman SM.** (2010). NSAIDs: how they work and their prospects as therapeutics in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci.*, 2:20.
- Sato N, Morishita R.** (2014). Brain alterations and clinical symptoms of dementia in diabetes: $\alpha\beta$ /tau-dependent and independent mechanisms. *Front Endocrinol.*, 5:143.
- Scarmeas N, Luchsinger JA, Schupf N, Brickman AM, Cosentino S, Tang MS, Stern Y.** (2009). Physical activity, diet and risk of Alzheimer disease. *JAMA*, 302(6):627-637.
- Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandeventer C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P.** (1999). Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*, 400(6740):173-177.
- Scheff SW, Price DA.** (2003). Synaptic pathology in Alzheimer's disease: a review of ultrastructural studies. *Neurobiol Aging*, 24(8):1029-1046.
- Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, DeKosky ST, Mufson EJ.** (2007). Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology*, 68(18):1501-1508.
- Schmitz C, Rutten BP, Pielen A, Schafer S, Wirths O, Tremp G, Czech C, Blanchard V, Multhaup G, Rezaie P, Korr H, Steinbusch HW, Pradier L, Bayer TA.** (2004). Hippocampal neuron loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol.*, 164(4):1143-1146.
- Schneider LS, Mangialasche F, Andreasen N, Feldman H, Giacobini E, Jones R, Mantua V, Mecocci P, Pani L, Winblad B, Kivipelto M.** (2014). Clinical trials and late-stage drug development for Alzheimer's disease: an appraisal from 1984 to 2014. *J Intern Med.*, 275(3):251-283.
- Scholz T, Mandelkow E.** (2014). Transport and diffusion of Tau protein in neurons. *Cell Mol Life Sci.*, 71:3139-3150.
- Seabrook TJ, Jiang L, Maier M, Lemere CA.** (2006). Minocycline affects microglia activation, Abeta deposition, and behavior in APP-tg mice. *Glia*, 53:776-782.
- Selkoe DJ.** (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.*, 81(2):741-766.
- Selkoe DJ.** (2004). Cell biology of protein misfolding: The examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat Cell Biol.*, 6(11):1054-1061.
- Selkoe DJ.** (2008). Biochemistry and molecular biology of amyloid beta-protein and the mechanism of Alzheimer's Disease. *Handb Clin Neurol.*, 89:245-260.
- Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT.** (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, 1(1):a006189.
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ.** (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med.*, 14(8):837-842.

- Shen J, Bronson RT, Chen DF, Xia W, Selkoe DJ, Tonegawa S.** (1997). Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell*, 89(4):629-639.
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Pollen D, Brookes A, Saseanu P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HAR, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH.** (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, 375(6534):754-760.
- Shi JQ, Shen W, Chen J, Wang BR, Zhong LL, Zhu YW, Zhu HQ, Zhang QQ, Zhang YD, Xu J.** (2011). Anti-TNF- α reduces amyloid plaques and tau phosphorylation and induces CD11c-positive dendritic-like cell in the APP/PS1 transgenic mouse brains. *Brain Res.*, 1368:239-247.
- Shimizu E, Kawahara K, Kajizono M, Sawada M, Nakayama H.** (2008). IL-4-induced selective clearance of oligomeric beta-amyloid peptide(1-42) by rat primary type 2 microglia. *J Immunol.*, 181:6503-6513.
- Sivilia S, Lorenzini L, Giuliani A, Gusciglio M, Fernandez M, Baldassarro VA, Mangano C, Ferraro L, Pietrini V, Baroc MF, Viscomi AR, Ottonello S, Villetti G, Imbimbo BP, Calzà L, Giardino L.** (2013). Multi-target action of the novel anti-Alzheimer compound CHF5074: in vivo study of long term treatment in Tg2576 mice. *BMC Neurosci.*, 14:44.
- Simard AR, Soulet D, Gowing G, Julien JP, Rivest S.** (2006). Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron*, 49(4):489-502.
- Simic G, Lucassen PJ, Krsnik Z, Kostovic I, Windblad B, Bogdanovic N.** (2000). nNOS expression in reactive astrocytes correlates with increased cell death related DNA damage in the hippocampus and entorhinal cortex in Alzheimer's disease. *Exp Neurol.*, 165(1):12-26.
- Small DH.** (2008). Network dysfunction in Alzheimer's disease: does synaptic scaling drive disease progression? *Trends in Molecular Medicine*, 14(3):103-108.
- Small DH.** (2009). Dysregulation of calcium homeostasis in Alzheimer's disease. *Neurochem Res.*, 34:1824-1829.
- Sokolowski JD, Mandell JW.** (2011). Phagocytic clearance in neurodegeneration. *Am J Pathol.*, 178(4):1416-1428.
- Sparks DL.** (2007). Alzheimer disease statins in the treatment of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.*, 7:662-663.
- Spires-Jones TL, Hyman BT.** (2014). The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron*, 82(4):756-771.
- Streit WJ.** (2005). Microglia and neuroprotection: implications for Alzheimer's disease. *Brain Res Rev.*, 48(2):234-239.
- Streit WJ, Xue QS, Tischer J, Bechmann I.** (2014). Microglial pathology. *Acta Neuropathol Commun.*, 2(1):142.
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD.** (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *PNAS*, 90(5):1977-1981.
- Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Bürki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B.** (1997). Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(24):13287-13292.
- Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M.** (2000). Pathogenic mechanisms of Alzheimer's disease analyzed in the APP23 transgenic mouse model. *Ann N Y Acad Sci.*, 920:134-139.
- Tai LM, Ghura S, Koster KP, Liakaite V, Maienschein-Cline M, Kanabar P, Collins N, Ben-Aissa M, Lei AZ, Bahroos N, Green SJ, Hendrickson B, Van Eldik LJ, LaDu MJ.** (2015). APOE-modulated A β -induced neuroinflammation in Alzheimer's disease: current landscape, novel data, and future perspective. *J Neurochem.*, 133(4):465-488.
- Takahashi RH, Milner TA, Li F, Nam EE, Edgar MA, Yamaguchi H, Beal MF, Xu H, Greengard P, Gouras GK.** (2002). Intraneuronal Alzheimer Ab42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology. *Am J Pathol.*, 161:869-1879.
- Tampellini D, Gouras GK.** (2010). Synapses, synaptic activity and intraneuronal abeta in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci.*, 2;2. pii: 13.
- Tanemura K, Akagi T, Murayama M, Kikuchi N, Murayama O, Hashikawa T, Yoshiike Y, Park JM, Matsuda K, Nakao S, Sun X, Sato S, Yamaguchi H, Takashima A.** (2001). Formation of filamentous tau aggregations in transgenic mice expressing V337M human tau. *Neurobiol Dis.*, 8(6):1036-1045.
- Tanemura K, Chui DH, Fukuda T, Murayama M, Park JM, Akagi T, Tatebayashi Y, Miyasaka T, Kimura T, Hashikawa T, Nakano Y, Kudo T, Takeda M, Takashima A.** (2006). Formation of tau inclusions in knock-in mice with familial Alzheimer disease (FAD) mutation of presenilin 1 (PS1). *J Biol Chem.*, 281(8):5037-5041.
- Tang Y, Le W.** (2015). Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol.* 136(6):E475-487.

- Tanzi RE, McClatchey AI, Lamperti ED, Villakomaroff L, Gusella JF, Neve RL.** (1988). Protease inhibitor domain encoded by an amyloid protein precursor mRNA associated with Alzheimer's disease. *Nature*, 331(6156):528-530.
- Tatebayashi Y, Miyasaka T, Chui DH, Akagi T, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Tanemura K, Murayama M, Ishiguro K, Planel E, Sato S, Hashikawa T, Takashima A.** (2002). Tau filament formation and associative memory deficit in aged mice expressing mutant (R406W) human tau. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(21):13896-13901.
- Ter Laak HJ, Renkawek K, van Workum FP.** (1994). The olfactory bulb in Alzheimer disease: a morphologic study of neuron loss, tangles, and senile plaques in relation to olfaction. *Alzheimer Dis Assoc Disord.*, 8(1):38-48.
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA and Katzman R.** (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol.*, 30(4):572-580.
- Thal DR, Capetillo-Zarate E, Del Tredici K, Braak H.** (2006). The development of amyloid β protein deposits in the aged brain. *Sci Aging Knowledge Environ.*, 6:re1.
- Thinakaran G, Borchelt DR, Lee MK, Slunt HH, Spitzer L, Kim G, Ratovitsky T, Davenport F, Nordstedt C, Seeger M, Hardy J, Levey AI, Gandy SE, Jenkins NA, Copeland NG, Price DL, Sisodia SS.** (1996). Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron*, 17(1):181-190.
- Thinakaran G, Koo EH.** (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem.*, 283(44):29615-29619.
- Tomiyama T, Kaneko H, Kataoka Ki, Asano S, Endo N.** (1997). Rifampicin inhibits the toxicity of pre-aggregated amyloid peptides by binding to peptide fibrils and preventing amyloid-cell interaction. *Biochem J.*, 322(Pt 3):859-865.
- Tuppo EE, Arias HG.** (2005). The role of the inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol.*, 37(2):289-305.
- Ubhi K, Masliah E.** (2013). Alzheimer's disease: recent advances and future perspectives. *J Alzheimers Dis.*, 33:S185-S194.
- Van Dam D, De Deyn PP.** (2011). Animal models in the drug discovery pipeline for Alzheimer's disease. *Br J Pharmacol.*, 164(4):1285-1300.
- Van Strien NM, Cappaert NL, Witter MP.** (2009). The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci.*, 10(4):272-282.
- Varnum MM, Ikezu T.** (2012). The classification of microglial activation phenotypes on neurodegeneration and regeneration in Alzheimer's disease brain. *Arch Immunol Ther Exp.*, 60:251-266.
- Vassar R, Kovacs DM, Yan R, Wong PC.** (2009). The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. *J Neurosci.*, 29(41):12787-12794.
- Vereecken TH, Vogels OJ, Nieuwenhuys R.** (1994). Neuron loss and shrinkage in the amygdale in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 15(1):45-54.
- Verkhratsky A, Olabarria M, Noristani HN, Yeh CY, Rodriguez JJ.** (2010). Astrocytes in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, 7(4):399-412.
- Vetrivel KS, Zhang Y, Xu Huaxi, Thinakaran G.** (2006). Pathological and physiological functions of presenilins. *Mol Neurodegener.*, 1:4.
- Viola KL, Klein WL.** (2015). Amyloid β oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathol.*, 129:183-206.
- Vogels OJ, Broere CA, ter Laak HJ, ten Donkelaar HJ, Nieuwenhuys R, Schulte BP.** (1990). Cell loss and shrinkage in the nucleus basalis Meynert complex in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 11(1):3-13.
- Voytko ML, Tinkler GP.** (2004). Cognitive function and its neural mechanisms in nonhuman primate models of aging, Alzheimer disease, and menopause. *Front Biosci.*, 9:1899-1914.
- Vulih-Shultzman I, Pinhasov A, Mandel S, Grigoriadis N, Touloumi O, Pittel, Z, Gozes I.** (2007). Activity-dependent neuroprotective protein snippet NAP reduces tau hyperphosphorylation and enhances learning in a novel transgenic mouse model. *J Pharmacol Exp Ther.*, 323:438-449.
- Walsh DM, Lomakin A, Benedek GB, Maggio JE, Condron MM, Teplow DB.** (1997). Amyloid β -protein fibrillogenesis: Detection of a protofibrillar intermediate. *J Biol Chem.*, 272(35):22364-22374.
- Walsh DM, Selkoe DJ.** (2007). Abeta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem.*, 101(5):1172-84.
- Wang HY, Lee DH, D'Andrea MR, Peterson PA, Shank RP, Reitz AB.** (2000). Beta-amyloid(1-42) bind to alpha7nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem.*, 275(8):5626-5632.
- Wang JZ, Xia YY, Grundke-Iqbal I, Iqbal K.** (2013). Abnormal hyperphosphorylation of Tau: sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration. *J Alzheimers Dis.*, 33:S123-S139.
- Webster SJ, Bachstetter AD, Nelson PT, Schmitt FA, Van Eldik LJ.** (2014). Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral

- changes in 10 mouse models. *Front Genet.*, 5(88):1-23.
- West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC.** (1994). Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet*, 344(8925):769-772.
- Whitehouse PJ, Price DL, Clark AW, Coyle JT, DeLong MR.** (1981). Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann Neurol.*, 10(2):122-126.
- Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR.** (1982). Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science*, 215(4537):1237-39.
- Wisniewski T, Goñi F.** (2015). Immunotherapeutic approaches for Alzheimer's disease. *Neuron*, 85(6):1162-1176.
- Wolfe MS, Kopan R.** (2004). Intramembrane proteolysis: theme and variations. *Science*, 305(5687):1119-1123.
- Wolfe MS, Guénette SY.** (2007). APP at a glance. *J Cell Sci.*, 120(Pt 18):3-3157-3161.
- Wood WG, Li L, Müller W, Eckert GP.** (2014). Cholesterol as a causative factor in Alzheimer's disease: a debatable hypothesis. *J Neurochem.*, 129:559-572.
- Woodhouse A., Vickers JC, Adlard PA, Dickson TC.** (2009). Dystrophic neurites in TgCRND8 and Tg2576 mice mimic human pathological brain aging. *Neurobiol Aging*, 30:864-874.
- Wright AL, Zinn R, Hohensinn B, Konen LM, Beynon SB, Tan RP, Clark IA, Abdipranoto A, Vissel B.** (2013). Neuroinflammation and neuronal loss precede A β plaque deposition in the hAPP-J20 mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One*, 8(4):e59586
- Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F, Silverstein SC, Husemann J.** (2003). Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med.*, 9(4):453-457.
- Wyss-Coray T.** (2006). Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response?. *Nat Med.*, 12(9):1005-1015.
- Yamada K, Nabeshima T.** (2000). Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharmacol Ther.*, 88:93-113.
- Yamashima T.** (2013). Reconsider Alzheimer's disease by the "calpain-cathepsin hypothesis" – A perspective review. *Prog Neurobiol.*, 105:1-23.
- Yan P, Hu X, Song K, Yin K, Bateman RJ, Cirrito JR, Xiao Q, Hsu FF, Turk JW, Xu J, Hsu CY, Holtzman DM, Lee JM.** (2006). Matrix metalloproteinase-9 degrades amyloid beta fibrils in vitro and compact plaques in situ. *J Biol Chem.*, 281(34): 24566-24574.
- Yang CN, Shiao YJ, Shie FS, Guo BS, Chen PH, Cho CY, Chen YJ, Huang FL, Tsay HJ.** (2011). Mechanism mediating oligomeric A β clearance by naïve primary microglia. *Neurobiol Dis.*, 42(3):221-230.
- Yokokura M, Mori N, Yagi S, Yoshikawa E, Kikuchi M, Yoshihara M, Wakuda T, Sugihara G, Takebayashi K, Suda Si, Iwata Y, Ueki T, Tsuchiya KJ, Suzuki K, Nakamura K, Ouchi Y.** (2011). In vivo changes in microglial activation and amyloid deposits in brain regions with hypometabolism in Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 38(2):343-351.
- Yoshiyama Y, Higuchi M, Zhang B, Huang SM, Iwata N, Saido TC, Maeda J, Suhara T, Trojanowski JQ, Lee VM.** (2007). Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron*, 53(3):337-351.
- Yu WH, Kumar A, Peterhoff CM, Shapiro Kulnane L, Uchiyama Y, Lamb BT, Cuervo AM, Nixon RA.** (2004). Autophagic vesicles are enriched in amyloid precursor protein secretase activities: implications for beta-amyloid peptide overproduction and localization in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol.*, 36:2531-2540.
- Yu JT, Tan L, Hardy J.** (2014). Apolipoprotein E in Alzheimer's disease: an update. *Annu Rev Neurosci.*, 37:79-100.
- Yu Y, Ye RD.** (2015). Microglial A β receptors in Alzheimer's disease. *Cell Mol Neurobiol.*, 35(1):71-83.
- Zerbinatti CV, Wahrle SE, Kim H, Cam JA, Bales K, Paul SM, Holtzman DM, Bu G.** (2006). Apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor-related protein facilitate intraneuronal Abeta42 accumulation in amyloid model mice. *J Biol Chem.*, 281(47):36180-86.
- Zhang B, Maiti A, Shively S, Lakhani F, McDonald-Jones G, Bruce J, Lee EB, Xie SX, Joyce S, Li C, Toleikis PM, Lee VM, Trojanowski JQ.** (2005). Microtubule-binding drugs offset tau sequestration by stabilizing microtubules and reversing fast axonal transport deficits in a tauopathy model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102:227-231.
- Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H.** (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain*, 4:3.
- Zhu X, Perry G, Smith MA.** (2005). Insulin signalling, diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis.*, 7(1):81-84.
- Zuccato C, Cattaneo E.** (2009). Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurol.*, 5:311-322.



2.

Material y métodos

2.1. Animales de experimentación

En el presente trabajo se han empleado ratones transgénicos (tg) para la enfermedad de Alzheimer, pertenecientes a los siguientes genotipos:

- Ratones simple transgénicos PS1_{M146L} (con fondo genético C57BL/6), que sobreexpresan la forma humana de la Presenilina-1 con la mutación M146L, bajo el control del promotor HMGC_oA-reductasa.
- Ratones simple transgénicos APP_{SL}, en adelante APP, con fondo genético C57BL/6, que sobreexpresan el APP₇₅₁ humano con las mutaciones *Swedish* (KM670/671NL) y *London* (V717I) del Alzheimer familiar (Fig. 2.1), bajo el control del promotor Thy-1, específico de células principales.
- Ratones doble transgénicos PS1_{M146L}/APP_{751SL}, en adelante PS1/APP, con fondo genético C57BL/6. Estos ratones se obtuvieron por cruce de ratones transgénicos homocigotos PS1_{M146L} (HO; PS1^{+/+}), con ratones tg APP_{751SL} (Fig. 2.1) heterocigotos (HE; APP^{+/-}, Transgenic Alliance). Ver cruces en Fig. 2.2 (parentales recuadrados en negrita). Los ratones pertenecen a la generación F6-F10 de los ratones tg heterocigotos.
- Ratones doble transgénicos PS1_{dE9}/APPs (línea 85), en adelante PS1d9/APP. Estos ratones sobreexpresan el gen *APP* en su isoforma 695 con la mutación *Swedish* (APPs: K594M/M596L) y el gen *PS1* que presenta una delección del exón 9 (PS1_{dE9}), bajo el control del promotor PrP. Estos animales (con fondo genético C57BL/6) proceden de Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) (Jankowsky y col., 2004).

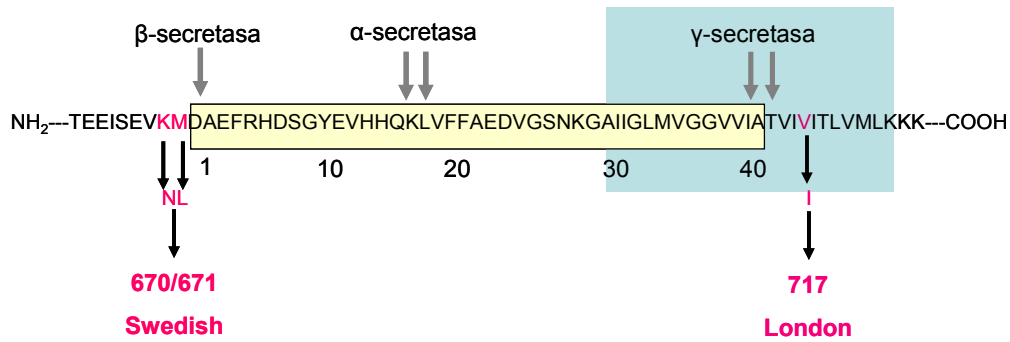


Figura 2.1. Esquema de las mutaciones familiares del Alzheimer que contiene la secuencia aminoacídica de la proteína APP₇₅₁ humana en el animal transgénico APP_{SL} y en el doble transgénico PS1_{M146L}/APP_{751SL}. En el esquema se muestra la secuencia de la proteína APP, indicando la doble mutación que presentan los animales PS1/APP. Se trata de las mutaciones *Swedish* (doble mutación que afecta a los aminoácidos 670 y 671 [KM670/671NL]) y *London* (en el aminoácido 717 [V717I]). La secuencia en amarillo son los aminoácidos que forman la proteína β-amiloide tras su procesamiento, la cual no se ve afectada directamente por las mutaciones. La zona en azul es la fracción de membrana y las flechas indican las zonas de corte de las enzimas implicadas en el procesamiento. Por procesamiento alternativo, se pueden producir 8 isoformas diferentes de APP, siendo la isoforma 751 la sobreexpresada en este modelo.

- Ratones Thy-Tau22, en adelante TAU, que expresan la forma humana de Tau de 4 repeticiones, con las mutaciones G272V y P301S, bajo el control del promotor Thy1.2 (Schindowski y col., 2006).

Además, como controles se han utilizado ratones no transgénicos (*wildtype*, WT) del mismo fondo genético. Los animales, pertenecientes a los diferentes genotipos, fueron analizados a diferentes edades (2, 4, 6, 9, 12 y 18 meses) y, en cada diseño experimental, las muestras de diferentes genotipos y edades fueron procesadas de forma simultánea.

Los animales transgénicos PS1_{M146L}/APP_{751SL}, así como parentales PS1 y APP para formar las correspondientes colonias y generar los dobles transgénicos, han sido suministrados por la industria farmacéutica Sanofi (París, Francia) a través de Charles-River Laboratories (Francia). Los animales TAU de las diferentes edades analizadas fueron suministrados también por Sanofi.

La generación y caracterización inicial de los ratones transgénicos PS1_{M146L}/APP_{751SL} ha sido previamente descrita (Blanchard y col., 2003). Los animales se mantuvieron en el Estabulario de los Servicios Centrales de Investigación de la Universidad de Málaga bajo condiciones de temperatura media controlada de 21±1 °C y un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 de oscuridad. Durante el tiempo de permanencia en el Estabulario, los animales tuvieron libre acceso al agua y una dieta *ad libitum* estándar.

A los 8-9 días del parto, se tomaban muestras de ADN de las crías para realizar el genotipado mediante PCR convencional, seguida de una electroforesis en la que se buscaba la presencia de la banda correspondiente a los transgenes APP (cruces APP x WT y PS1 x APP) o PS1 (cruces PS1_{HE} x WT y PS1_{HE} x PS1_{HE}) (Apéndice 2.12.1) humanos mutados.

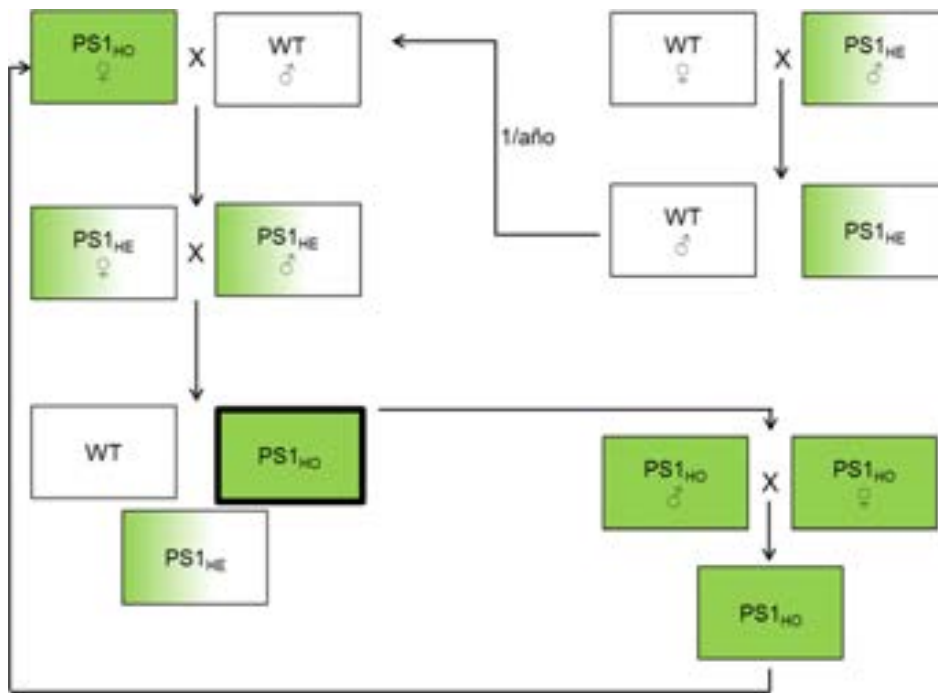
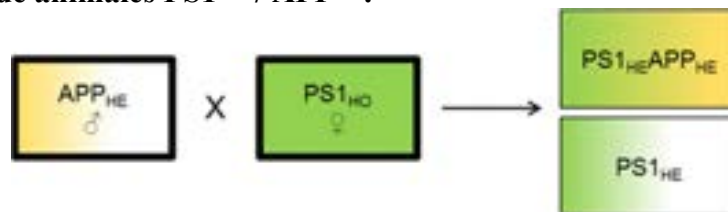
A. Mantenimiento de parentales heterocigotos para APP ($APP^{+/-}$):**B. Mantenimiento de parentales homocigotos para PS1 ($PS1^{+/+}$):****C. Generación de animales $PS1^{+/+} / APP^{+/-}$:**

Figura 2.2. Mantenimiento de parentales y generación de animales doble transgénicos PS1/APP. Para el mantenimiento de los progenitores APP heterocigotos (A) basta con la realización de cruces con hembras WT, siendo la mitad de la descendencia APP heterocigota (APP_{HE}). Sin embargo, el mantenimiento de los progenitores PS1 (B) requiere varios cruces sucesivos para recuperar la homocigosis de los mismos (rendimiento $PS1_{HO}$ de cruces $PS1_{HE} \times PS1_{HE} = 1/4$). Además, cada cierto tiempo se requiere la introducción en la cadena de nuevos WT para el mantenimiento del vigor híbrido. Por último, para la generación de los animales doble tg (C) se cruzaron machos APP_{HE} con hembras $PS1_{HO}$ resultantes de los cruces anteriores (recuadros en negrita), generándose la mitad de los animales PS1/APP y la otra mitad animales $PS1_{HE}$. El protocolo de genotipado se muestra en el Apéndice 2.12.1.

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con el RD 1201/2005 del 10 de Octubre (BOE 21/10/2005) para el mantenimiento y uso de animales de laboratorio, y de acuerdo con el Real Decreto 53/2013 del 1 de febrero (BOE 08/02/2013) para la protección

de los animales utilizados en experimentación. Además los experimentos fueron aprobados por el Comité de Uso de Animales para la Investigación de la Universidad de Málaga. El número de animales utilizados, así como el estrés y sufrimiento de éstos durante la manipulación y experimentación fueron reducidos al máximo, de acuerdo a la regla de las 3R (reemplazar, reducir y refinar).

2.1.1. Animales con dieta suplementada con litio

Para el estudio del tratamiento con litio se emplearon animales transgénicos PS1_{M146L} y PS1_{M146L}/APP_{751SL} (n=25 por grupo). A estos animales se les administró una dieta de libre acceso con un contenido de 1,2 g de carbonato de litio por kg de producto (Harlan Laboratories), mientras que a los animales control se les administró una dieta estándar. El grupo tratado recibió, además, un suplemento de cloruro sódico (0,7%) en la bebida. El tratamiento se prolongó durante 6 meses, desde los 3 hasta los 9 meses de edad.

Los animales se pesaron semanalmente y no se detectaron pérdidas significativas de peso (29,20±1,09 g vs. 27,50±2,2 g para los animales PS1/APP control y tratados, respectivamente). El contenido plasmático de litio se determinó a partir de la arteria ocular y los niveles se mantuvieron estables durante todo el tratamiento y dentro del rango terapéutico: 0,44±0,07 mEq/l (n=10) después de 71 días de tratamiento o 0,38±0,05 mEq/l (n=10) al final del tratamiento.

Este tratamiento fue bien tolerado por los animales ya que la mortalidad durante el mismo fue muy baja (0% en el caso de los animales PS1 control; 0% en los PS1 litio; 20% en los PS1/APP control; 7,4% en los PS1/APP tratados con litio).

2.1.2. Animales tratados con el compuesto NST0037 (nueva estatina no comercial; Neuron Bio)

Estos animales fueron tratados y suministrados por la empresa Neuron Bio (España). El fármaco consiste en una estatina no comercial, NST0037, diseñada por la propia empresa (Fig. 2.3). Se ha descrito que este compuesto tiene capacidad neuroprotectora y antiinflamatoria, y es hipocolesterolémico y antiepiléptico (para más información acerca de la patente de esta estatina ver <http://www.google.com/patents/EP2241561A1?cl=en>).

Los animales, todos transgénicos PS1_{d9}/APP, se dividieron en tres grupos (A, B y C). El grupo A lo conforman los animales que han recibido una dieta enriquecida en NST0037, el grupo B recibió una dosis menor del compuesto, y el grupo C corresponde al grupo control que recibió una dieta normal. Ambas dosis fueron bien toleradas por los animales y, según Neuron Bio, no afectaron a la mortalidad de los animales tratados en comparación con los individuos controles. Además, los individuos bajo tratamiento no mostraron ningún efecto adverso al tratamiento, indicando la buena tolerancia de este fármaco. El tratamiento se prolongó durante 6 meses (iniciándose a los 6 meses de edad y finalizando a los 12 meses de edad de los animales).

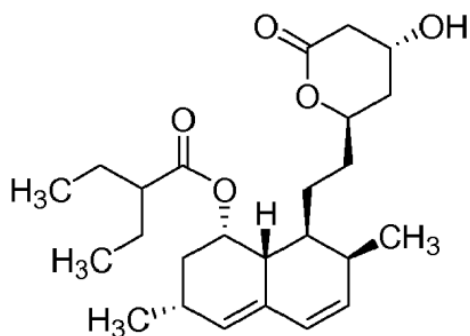


Figura 2.3. Fórmula química de la estatina no comercial NST0037 diseñada por Neuron Bio. Esta molécula, (1S,2S,6R,8S,8aR)-1,2,6,7,8,8a-hexahidro-3,7-dimetil-8[2-[(2R,4R)-tetrahidro-4-hidroxi-6-oxo-2H-piran-2-yl]etil]-1-naftalenil-2-etil-butirato, nombrada aquí como NST0037, es un agente con potencial neuroprotector, además de tener la capacidad de reducir los niveles lipídicos (colesterol y triglicéridos) en sangre, con capacidad antiepiléptica. Además, este compuesto es más seguro que las estatinas comerciales, mostrando niveles de toxicidad por debajo de los mostrados por la simvastatina.

2.1.3. Animales modificados genéticamente: APP/IL4^{-/-}

Para comprobar *in vivo* el papel de las interleuquinas antiinflamatorias sobre el proceso de activación microglial en la EA, se realizó el cruce de un ratón *knockout* (KO) de IL-4 (IL4^{-/-}) de origen comercial (Jackson Laboratory) con un modelo transgénico de la enfermedad de Alzheimer. En primer lugar se eligió el modelo bigénico PS1d9/APP en lugar de un APP, por presentar el doble transgénico una patología mayor. Una vez conseguida la homocigosis para IL4^{-/-} mediante retrocruces, los animales PS1/APPxIL4^{-/-} se envejecieron hasta 6, 12 y 18 meses. Estas edades se seleccionaron en base a datos previos. En contra de lo esperado en nuestra hipótesis inicial, los animales PS1/APPxIL4^{-/-} de 6, 12 y, más patentemente, a los 18 meses de edad, presentaban menor acumulación de A β y menor deposición de placas extracelulares, una menor degeneración de neuronas GABAérgicas y una menor activación glial. Inicialmente, estos resultados parecían contradecir nuestra hipótesis de trabajo, indicando que la ausencia de IL-4 ejercía una función protectora dentro del desarrollo de la patología de estos modelos. Dentro de las posibles explicaciones para intentar esclarecer esta aparente controversia, existía la posibilidad de que se estuviera produciendo una selección de los animales con menor patología. Para comprobarlo, realizamos las curvas de supervivencia de los distintos modelos (Fig. 2.4).

A pesar de que los parentales IL4^{-/-} y PS1d9/APP son viables, los PS1d9/APPxIL4^{-/-} presentaban una muy elevada mortalidad en el primer trimestre de vida. De hecho, casi el 80% de los animales PS1/APPxIL4^{-/-} fallecen durante los tres primeros meses de vida. A los 6 meses de edad, cuando comenzamos el análisis fenotípico, la mortalidad suponía un valor de casi el 95%. En base a estos datos, creemos que lo más razonable para explicar los datos observados es la enorme selección de los animales PS1/APPxIL4^{-/-}. Es posible que los animales que sobreviven a los primeros meses de vida sean los que presentan un efecto reducido de las proteínas transgénicas. De esta forma, los únicos supervivientes son aquellos ratones PS1/APPxIL4^{-/-} sin prácticamente patología. Los animales PS1/APPxIL4^{-/-} de un mes no presentaron ninguna patología clásica de la EA (placas de A β , neuroinflamación, neurodegeneración, etc.).

No conocemos las causas que determinan esta alta tasa de mortalidad perinatal. Como posible hipótesis de trabajo, y teniendo en cuenta que tanto IL-4 como PS1 son necesarias para la maduración del sistema inmune, la alta tasa de muerte observada en los primeros meses, podría ser debida a fallos en la maduración postnatal del sistema inmune. Para intentar paliar este efecto no deseado, e inesperado, se decidió cambiar de modelo de EA y se procedió a cruzar los KO de IL-4 con el modelo animal APP_{SL}, preservando, de esta manera, la función de PS1 y γ -secretasa en el sistema inmune. Hasta la fecha, los nuevos animales en homocigosis APP/IL4^{-/-} presentan una menor tasa de mortalidad (60% de supervivencia en el primer trimestre; Fig. 2.4). Los animales KO de IL-4 fueron cruzados con los APP por al menos tres generaciones con el fin de conseguir la homocigosis IL4^{-/-}. El genotipo de los distintos ratones fue comprobado mediante PCR utilizando técnicas estándar y los cebadores recomendados por Jackson (ver Apéndice 2.12.1). Para distinguir la heterocigosis de la homocigosis, la expresión de IL-4 fue también ensayada, mediante RT-PCR, en las células de los ganglios linfáticos y del bazo de los animales.

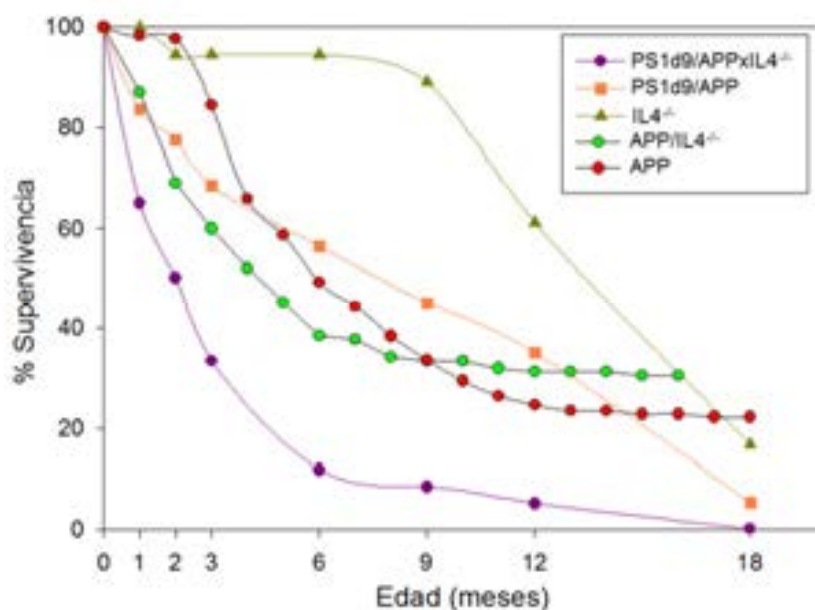


Figura 2.4. Curva de supervivencia de los animales PS1/APPxIL4^{-/-}, PS1d9/APP, IL4^{-/-}, APP/IL4^{-/-} y APP. Se muestra la alta mortalidad observada en los animales PS1/APPxIL4^{-/-} en los tres primeros meses de vida (donde el porcentaje de supervivencia está alrededor del 20%). Sin embargo, la supervivencia de los animales APP/IL4^{-/-} es similar a la observada en los animales APP.

Como se ha comentado, los ratones homocigotos IL4^{-/-} proceden de Jackson Laboratory. Estos animales presentan una expresión reducida de IgE e IgG1 y de otros marcadores cuya expresión depende de IL-4. La producción de citoquinas derivadas de Th2, como IL-10, también está reducida. La morfología microglial está alterada en estos animales y estas células no expresan el marcador Ym1.

La generación de los modelos PS1/APPxIL4^{-/-} (descartado por las razones anteriormente descritas) y APP/IL4^{-/-} (utilizado en esta Tesis Doctoral) ha sido realizada en el Estabulario de la Universidad de Sevilla en colaboración con el grupo del Dr. Javier Vitorica, con quien nuestro grupo mantiene proyectos coordinados de investigación.

2.1.4. Delimitación anatómica de las regiones de estudio

2.1.4.1. La formación hipocampal

Esta formación se encuentra severamente afectada en la enfermedad de Alzheimer y tiene una gran importancia en las funciones cognitivas (memoria y aprendizaje; Cooper y Lowenstein, 2002). Esta formación es una porción de la corteza cerebral que forma una especie de cuerno a lo largo de la curvatura del ventrículo lateral (Fig. 2.5) y que está situada en el lóbulo temporal medial.

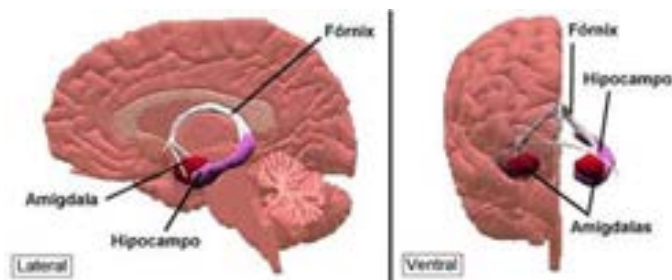


Fig. 2.5. Localización la formación hipocampal. El hipocampo se localiza en la superficie media del lóbulo temporal.

La formación hipocampal está constituida por el subículo, el hipocampo propio (o *cornu ammonis*, CA) y la circunvolución dentada o giro dentado, todos los cuales constituyen la allocorteza de Brodmann (ver revisión Andersen y col., 2008).

En la parte rostral, el hipocampo aparece dorsalmente tras los niveles de los núcleos septales, delimitado inferiormente por el tálamo dorsal, superiormente por el cuerpo caloso y dorsolateralmente por el córtex parietal. Medialmente, el límite de la formación hipocámpica está formado por el giro dentado y la fimbria del hipocampo. Posteriormente se curva y se extiende ventralmente hacia el área amigdalóide, con las cortezas perirrinal y entorrinal, entre otras, definiendo sus límites laterales a estos niveles. Por su parte, el subículo aparece más caudalmente y limita dorsalmente con el cuerpo caloso y la corteza retrosplenial granular y lateralmente con CA1 y el giro dentado del hipocampo. Su parte ventral limita lateralmente con CA1 y el cuerpo caloso y centralmente con la parte posteromedial del área amigdalohipocámpal. Más caudalmente, el subículo dorsal limita dorsalmente con el postsubículo y el cuerpo caloso; lateralmente con CA1 y centralmente con el giro dentado del hipocampo. El subículo se continúa lateralmente con la corteza de la circunvolución parahipocámpica y el área de la perialocorteza. El subículo es el área de transición entre el hipocampo y la corteza entorrinal y es esencial para el flujo de información en el hipocampo.

El hipocampo está presente en las áreas de Bregma $-0,94$ a $-4,04$ mm, mientras que el subículo aparece más caudalmente, en los niveles $-2,46$ a $-4,36$ mm (Franklin y Paxinos, 2007; Fig. 2.6).

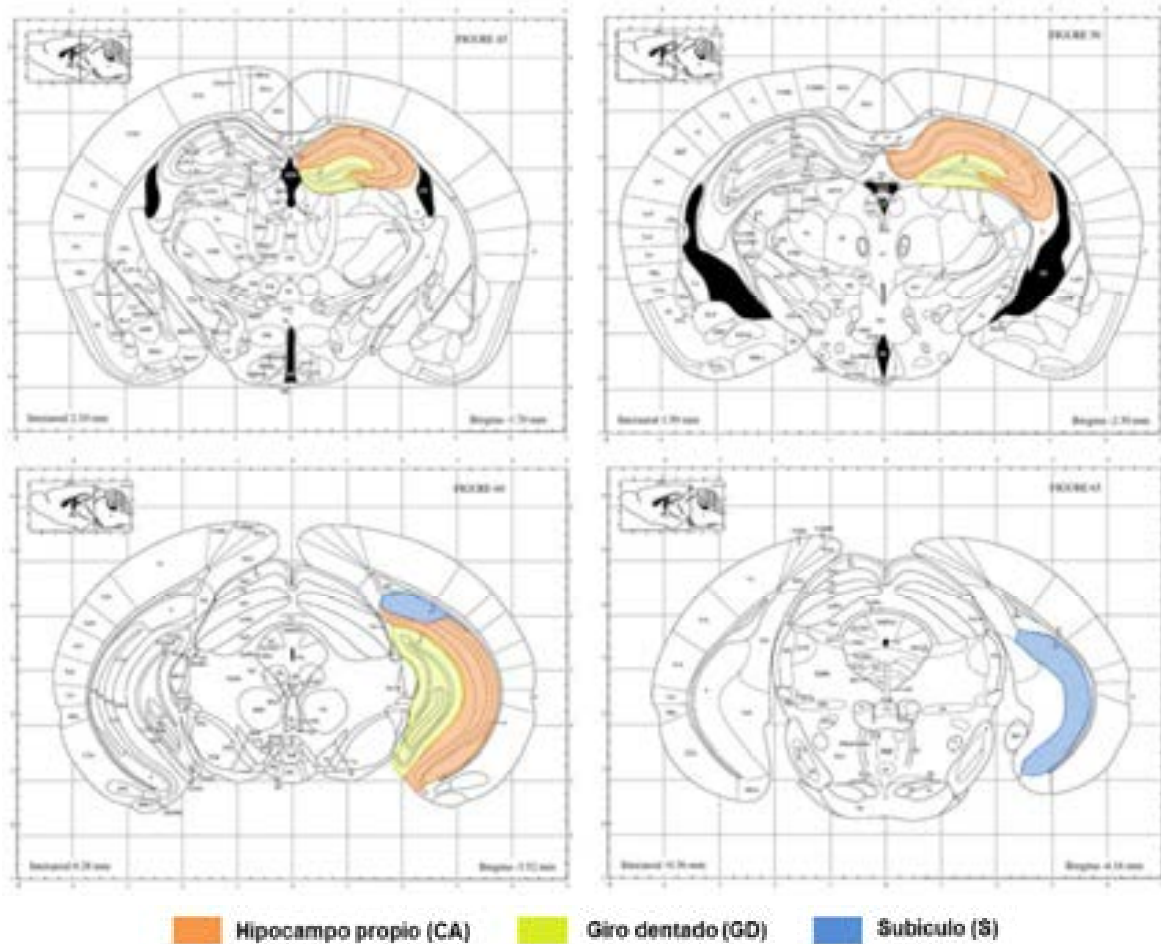


Figura 2.6. Delimitación anatómica de la formación hipocampal, compuesta por el hipocampo propio (regiones CA), el giro dentado (GD) y el subículo (S). Esquemas tomados del Atlas de Franklin y Paxinos (2007).

El hipocampo, el giro dentado y el subículo están constituidos por tres capas, lo que es característico de la arquicorteza (ver revisión Andersen y col., 2008; Van Strien, 2009).

En el hipocampo propiamente dicho encontramos:

- La capa externa, tradicionalmente dividida en dos estratos, *stratum radiatum* (sr) y estrato lacunoso-molecular (slm). En ella se ramifican las dendritas apicales de las células principales.
- La capa media, capa piramidal (sp), que contiene los somas de las neuronas principales o piramidales.
- La capa interna, *stratum oriens* (so), donde se encuentran las dendritas basales de las células piramidales. La parte más interna del hipocampo es una capa de axones mielínicos que surgen de los cuerpos celulares situados en el subículo y en el hipocampo. Esta capa, llamada *alveus*, se continúa con la fimbria del hipocampo, que a su vez se convierte en el fórnix (principal vía de conexión entre el hipocampo y otras estructuras cerebrales).

En el giro dentado se distingue:

- La capa externa llamada estrato molecular (sm), que contiene axones aferentes y dendritas de las células granulares y del hilo.
- En la capa media o granular (g) residen las células principales o granulares.
- La capa interna, conocida como hilio (h), posee los axones de las células granulares y neuronas intrínsecas.

El subículo consta de las siguientes capas:

- La capa molecular, que se continúa con el *stratum lacunosum-moleculare* y el *stratum radiatum* de CA1.
- Una amplia capa de células piramidales.
- La capa polimórfica.

En cada una de las capas de la formación hipocampal se encuentran diversos tipos de interneuronas (IN), que constituyen una población muy heterogénea. Además, en la formación hipocampal encontramos neuronas principales de naturaleza excitatoria (glutamatérgica) localizadas en las capas piramidales del hipocampo propio y subículo y en la capa granular del giro dentado (ver revisión Freund y Buzsáki, 1996; Andersen y col., 2008; Fig. 2.7).

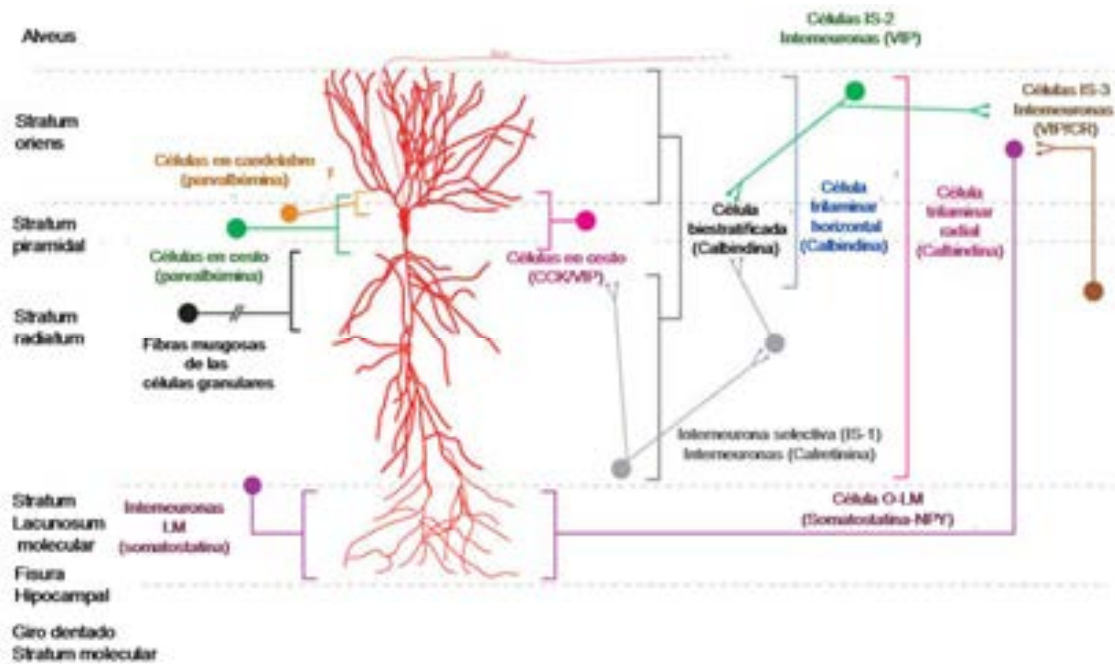


Figura 2.7. Representación esquemática de las aferencias GABAérgicas de las células piramidales del hipocampo propio. Las IN pueden ser clasificadas en función de las proteínas de unión a calcio que expresan y por su arborización axonal. En este esquema, los círculos corresponden a los somas neuronales y las llaves verticales indican la zona de la célula piramidal que recibe inervación GABAérgica. Bajo el nombre de cada tipo de interneurona se especifica, entre paréntesis, el tipo de proteína de unión a calcio y el neuropéptido que contiene. CCK: colecistoquinina; VIP: polipéptido intestinal vasoactivo; IS: células selectivas de interneuronas; O-LM: Interneuronas del *stratum oriens-lacunosum-moleculare*; NPY: Neuropéptido Y, CR: Calretinina (Adaptado de Danglot y col., 2006).

La corteza entorrinal (CE) constituye la mayor fuente de inervación cortical del hipocampo. El principal flujo de información a través del hipocampo se produce mediante el llamado circuito trisináptico, que comienza con la proyección desde la CE al hipocampo propio y principalmente al giro dentado (vía perforante; Witter y col., 2000; Van Groen y col., 2003; Witter, 2007). De forma breve podemos decir que desde el GD pasa a CA3 y de aquí a CA1 (ver revisión Andersen y col., 2008; Van Strien, 2009). El circuito finaliza con la proyección desde CA1 a la CE, bien directamente o a través del subículo (Fig. 2.8).

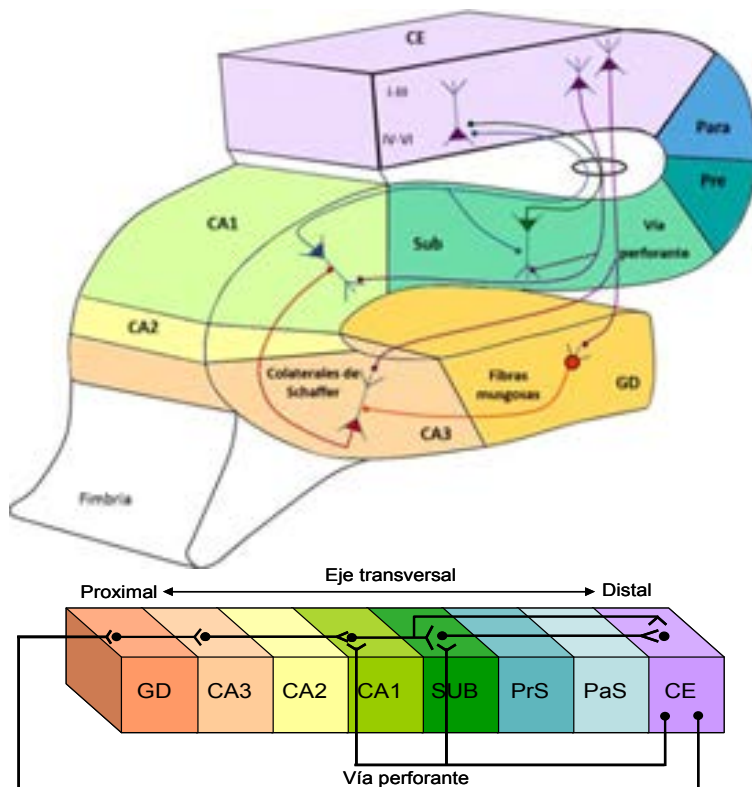


Figura 2.8. Esquema básico del circuito trisináptico. Las neuronas de las capa II de la corteza entorrinal proyectan hacia el giro dentado y CA3 a través de la vía perforante. Las neuronas de la capa III de la CE proyectan hacia CA1 y el subículo a través de la vía perforante y alvear. Tanto CA1 como el subículo proyectan hacia las capas profundas de la CE a través del haz angular. CE: corteza entorrinal; I-VI: capas de la CE; GD: giro dentado; Sub: subículo; Para: parasubiculo; Pre: presubiculo (Modificado de Andersen y col., 2008).

Las principales aferencias a la formación hipocampal, por tanto, proceden de la CE (Naber y Witter, 1998; Van Groen y col., 2002; 2003; Witter y col., 2000; Witter, 2007) y de otras estructuras límbicas como la región septal (Schäfer y col., 1998), la amígdala, y de núcleos del tronco encefálico. En cuanto a las eferencias de la formación hipocampal, éstas se originan principalmente en las células del subículo y, en menor medida, en las células piramidales del hipocampo propio. La mayor parte de estas proyecciones terminan en el núcleo mamilar medial, el hipotálamo y el tálamo. También existen proyecciones eferentes desde el subículo que se dirigen a la CE, la corteza cingulada y la amígdala.

2.1.4.2. Áreas corticales

En este trabajo se han analizado principalmente dos áreas corticales, la corteza retrosplenial granular (RSG) y la corteza visual primaria (V1) (Fig. 2.9). La primera, se extiende desde el área de Bregma $-0,94$ al $-4,24$; la segunda lo hace desde el nivel $-2,18$ al $-5,20$ (Franklin y Paxinos, 2007). La delimitación anatómica de estas regiones en las secciones procesadas para inmunohistoquímica, se realizó siempre en relación a las

estructuras cerebrales adyacentes, utilizando secciones consecutivas teñidas con violeta de cresilo (ver Apdo. 2.3.1) y de acuerdo con el atlas de Franklin y Paxinos (2007).

La corteza retrosplenial es importante para el aprendizaje espacial (Hindley y col., 2014) y se localiza entre la formación hipocampal y áreas de la neocorteza (Wyvisualss y Van Groen, 2004). Proyecta al complejo subicular y a las cortezas perirrinal y entorrinal, recibiendo aferencias de la formación hipocampal. En conjunto, las estrechas conexiones entre la corteza retrosplenial y la formación hipocampal sugieren que esta proyección proporciona una vía importante por la que el hipocampo participa en el aprendizaje y la memoria. Por su parte, la corteza visual primaria V1 parece intervenir en la memoria de reconocimiento visual (Cooke y Bear, 2015).

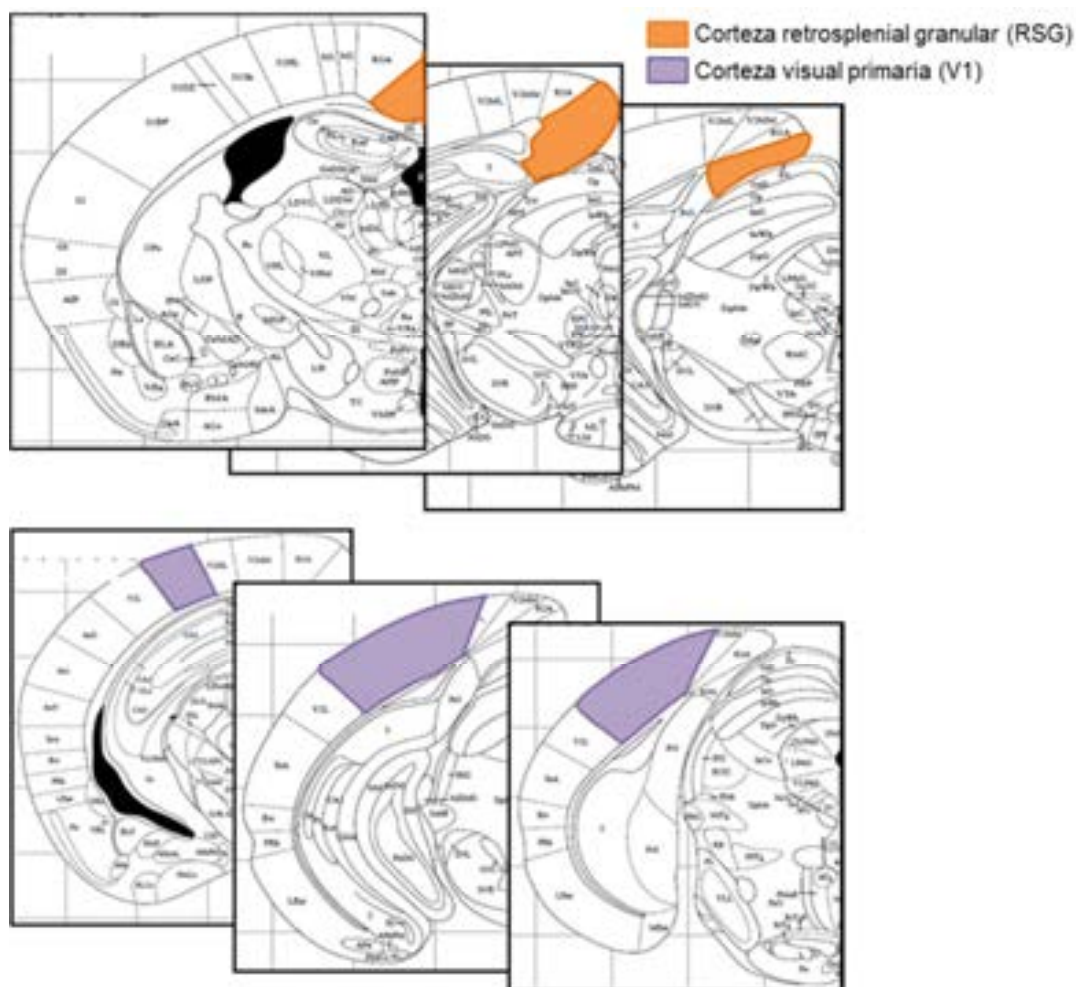


Figura 2.9. Delimitación anatómica de la corteza retrosplenial granular (RSG) y visual primaria (V1) en secciones coronales seriadas rostro-caudalmente. Esquemas tomados del Atlas de Franklin y Paxinos (2007).

2.1.4.3. Núcleos del telencéfalo basal

El telencéfalo basal (BF, del inglés *basal forebrain*) es una región localizada en la base del cerebro, en posición anterior al hipotálamo y ventral a los ganglios basales. A nivel frontal, limita con el tubérculo olfatorio y el núcleo *accumbens*, mientras que lateralmente lo hace con el complejo amigdalóide y la corteza piriforme (Détári y col.,

1999; Semba, 2000). Esta estructura está constituida por tres grandes áreas. La primera, localizada en la zona más rostral, es la denominada área septal medial, constituida por el *septum* medial (SM) y el núcleo vertical de la banda diagonal de Broca (vBDB). La zona más caudal del BF corresponde a la región del núcleo basal de Meynert (NBM; en ratón denominado núcleo *basalis magnocellularis*), el globo pálido ventral y la sustancia *innominata*. La tercera de las áreas está formada por el núcleo horizontal de la banda diagonal de Broca y el núcleo preóptico magnocelular (Wenk, 1997; Semba, 2000; Niewiadomska y col., 2009). De estos núcleos del BF, en este trabajo se han analizado el *septum* medial, el núcleo vertical de la banda diagonal de Broca y el núcleo basal de Meynert (Fig. 2.10).

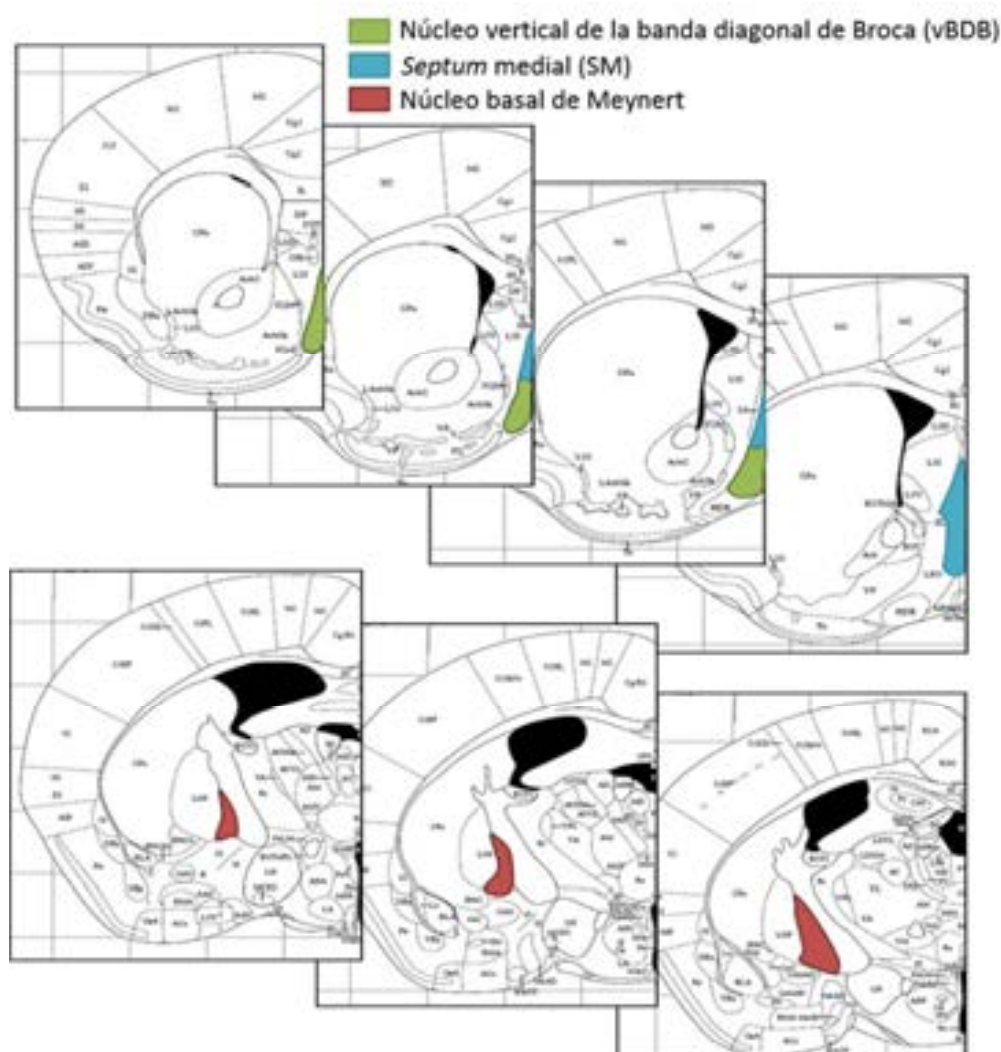


Figura 2.10. Delimitación anatómica de los núcleos del telencéfalo basal analizados en este trabajo en secciones coronales seriadas rostro-caudalmente. Esquemas tomados del Atlas de Franklin y Paxinos (2007).

El *septum* medial se localiza desde las áreas de Bregma 1,18 a 0,26 mm y el núcleo vertical de la banda diagonal de Broca aparece del nivel 1,34 al 0,74 mm. Por su parte, el NBM aparece más caudalmente, en las áreas de Bregma -0,34 a -1,06 mm (Franklin y

Paxinos, 2007). Para la correcta delimitación de estos núcleos se utilizó la tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo para la enzima colinacetyltransferasa pues en estos núcleos son especialmente abundantes las neuronas colinérgicas. Se han seleccionado estos núcleos debido a que son los que contienen población colinérgica que proyecta principalmente a corteza e hipocampo (para más detalle ver Bloque 3.2 de Resultados y Discusión).

2.2.

Preparación del tejido para microscopía óptica

2.2.1. Fijación

Los diferentes ratones transgénicos y los animales WT, fueron anestesiados profundamente con pentobarbital sódico (Dolethal®, 60 mg/Kg). Utilizando una bomba de perfusión (Dinko, D-25V), los animales fueron perfundidos transcardialmente, primero con tampón fosfato salino (PBS) 0,1M pH 7,4 (apéndice 2.12.2), durante 1 minuto, seguido de 200 ml de solución fijadora PLP compuesta por paraformaldehído 4%, L-lisina 75 mM y meta-peryodato sódico 10 mM en tampón fosfato (PB) 0,1M pH 7,4 (apéndice 2.12.3), a un flujo continuo de 10 ml/minuto. Posteriormente, se extrajeron los cerebros y se postfijaron por inmersión durante una noche en la misma solución fijadora a 4 °C.

2.2.2. Crioprotección y congelación

A continuación, se lavaron con tampón PBS 0,1M (3 lavados de 10 minutos cada uno), se crioprotegieron en sacarosa al 30% (apéndice 2.12.4), se congelaron con nieve carbónica durante 1 minuto y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior procesamiento.

2.2.3. Obtención de secciones en el microtomo de congelación

Para las técnicas inmunohistoquímicas y tinciones histológicas realizadas se emplearon secciones de 40 μm de grosor cortadas en el plano coronal (Fig. 2.11) que se obtuvieron en un microtomo de congelación (Leica, CM-1325). Las secciones se recogieron de forma seriada *free-floating* en placas multipocillos con PBS y 0,02% de azida sódica (para evitar el crecimiento fúngico). Las secciones se distribuyeron en 7 series (una serie por pocillo) de tal forma que dentro de una serie los cortes consecutivos distaban entre



Figura 2.11. Esquema de la orientación de una sección en plano coronal de un cerebro de ratón.

sí 280 μm ; por tanto, cada pocillo contiene una representación rostrocaudal de un 1/7 del total del cerebro y, además, en cada serie encontramos un número suficiente de secciones de las distintas regiones de estudio, para los estudios cuantitativos (estereología). Asimismo, esta distribución seriada de los cerebros permite la realización de una técnica distinta para cada serie, de tal forma que podemos analizar múltiples marcadores y hacer un estudio comparativo en un mismo animal a lo largo del eje rostrocaudal. Las placas que contenían las secciones seriadas se almacenaron a 4°C durante varios meses, renovando regularmente el tampón PBS con azida sódica. Cada experimento estaba compuesto por un grupo de tamaño muestral $n=3-6$ animales por genotipo.

2.3.

Tinciones histológicas

2.3.1. Tinción general con violeta de cresilo

El colorante violeta de cresilo ($\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3$; C1791), de naturaleza basófila, se une a ARN, ADN y proteínas asociadas localizadas en el núcleo y dispersas también en forma de

gránulos por el citoplasma de manera que marca todas las células (fundamentalmente el núcleo) de un color azul-violeta. El violeta de cresilo se emplea al 1% diluido en agua desionizada. A esta mezcla se le añade ácido acético glacial, en una concentración del 1% (apéndice 2.12.10). Esta tinción se ha utilizado para la correcta delimitación de las regiones de estudio. Para esta tinción se llevó a cabo el siguiente protocolo:

- Los cortes se montaron sobre portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar durante una noche en la estufa a 37 °C para su adhesión al vidrio.
- Se hidrataron los cortes con PBS 0,1M durante 20 minutos y con H₂O destilada durante 5 minutos.
- Incubación con la solución de violeta de cresilo (5-10 minutos).
- Lavar con H₂O destilada (30 segundos) para eliminar el exceso de colorante.
- Deshidratación: etanol de 70° (1 minuto), etanol de 96° con ácido acético al 10% (2 minutos), etanol absoluto (5 minutos) y xileno (15 minutos).
- Montaje con DPX.

2.3.2. Tinción de placas amiloides fibrilares con rojo congo

El rojo congo (C₃₂H₂₂N₆Na₂O₆S₂) se usa de forma específica para el marcaje de β-amiloide fibrilar, ya que se une de forma específica las fibras amiloides de los depósitos extracelulares con conformación de hoja plegada β (Wu y col., 2007). Igualmente, puede marcar esta conformación en los ovillos neurofibrilares de aquellas células que los presenten. Este colorante se ha utilizado como contratinción para delimitar la distribución de diversos marcadores en relación a las placas de β-amiloide. Esta tinción es visible tanto a microscopía óptica convencional como a microscopía de fluorescencia. Para realizarla se llevaron a cabo los siguientes pasos, todos en agitación:

- Lavar las secciones en PBS 0,1M (3 lavados de 10 minutos) para eliminar los restos de azida sódica.
- Incubar en rojo congo al 20% en etanol absoluto (ver apéndice 2.12.10) durante 3 minutos.
- Lavar el tejido en PBS 0,1M (3 lavados de 10 minutos) para eliminar el exceso de colorante.
- Montar las secciones en portaobjetos gelatinizados (ver apéndice 2.12.5) y dejar secar.
- Deshidratación y montaje con DPX (ver apéndice 2.12.7).

2.3.3. Marcaje fluorescente de placas amiloides fibrilares con Tioflavina S

La Tioflavina S (Tio-S) es una fluoresceína verde que marca de forma específica las placas seniles, al unirse a las fibras de β-amiloide en conformación de hoja plegada β, y

también a los ovillos neurofibrilares. Para esta tinción se realizó el siguiente protocolo (Bussiere y col., 2004):

- Lavar las secciones en PBS 0,1M (3 lavados de 10 minutos).
- Lavar 10 minutos en agua destilada.
- Incubar 10 minutos en la solución de Tioflavina S (ver apéndice 2.12.10) en oscuridad.
- Lavar en etanol al 50% (2 x 5 minutos).
- Lavar en agua destilada (2 x 5 minutos).
- Montar las secciones sobre portaobjetos gelatinizados y dejar secar unos minutos. Finalmente, colocar el cubreobjetos, utilizando como medio de montaje DABCO (ver apéndice 2.12.8). Las muestras se conservan en oscuridad a 4 °C.

2.4.

Técnicas inmunohistoquímicas para microscopía óptica a campo claro y fluorescencia

La técnica inmunohistoquímica se basa en la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo para detectar la presencia de una o varias moléculas en un tejido. Las secciones de cerebro de los diferentes animales (genotipos y/o tratamientos en su caso) y edades fueron siempre procesadas en paralelo, empleando las mismas soluciones para minimizar las condiciones de variabilidad en el proceso de inmunomarcaje.

En determinados casos, para aumentar/mejorar la exposición del antígeno a detectar fueron necesarios uno o varios pretratamientos:

- Permeabilización con detergente (anticuerpos anti-CatD, anti-LAMP2 y anti-LC3b): Las secciones se preincubaron durante una noche a 4°C con tampón PBS 0,1M a pH 7,4 con Tx-100 al 0,2% para incrementar la capacidad de penetración

del anticuerpo primario a través de los sistemas de membranas celulares. Al día siguiente se comenzó con el protocolo general de inmunohistoquímica.

- Tratamiento con calor (anticuerpos para CatD, ChAT, LAMP2, LC3b, p75, Tau fosforilado, Ubiquitina): Tras lavar los cortes con PBS 0,1M (3 x 10 minutos), se realizó una incubación en tampón citrato sódico pH 6 (apéndice 2.12.2) a 80°C durante 30 minutos, en agitación en un baño termostático (Unitronic, 320 UR; Selecta). A continuación, se dejaron enfriar durante 15 minutos y se lavaron en PBS 0,1M (3 x 10 minutos). Posteriormente, se procedió al protocolo convencional.
- Tratamiento con ácido fórmico (anticuerpos para β -amiloide): Tras lavar los cortes con PBS 0,1M (3 x 10 minutos), se realizó una incubación en ácido fórmico al 85% durante 5 minutos. A continuación, se lavó con PBS (3 x 10 minutos) y se procedió con el protocolo general.

El protocolo general de inmunohistoquímica utilizado constó de los siguientes pasos¹:

- Lavar el tejido en PBS 0,1M para eliminar los restos de azida sódica (3 x 10 minutos).
- Inhibición de la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3%/metanol al 10% en PBS 0,1M pH 7,4, durante 20 minutos.
- Lavar con PBS (3 x 10 minutos).
- Bloqueo de la avidina, biotina y las proteínas de unión a biotina que se encuentran de forma endógena, mediante el kit de bloqueo de avidina-biotina durante 30 minutos en cada solución, con un paso intermedio de un lavado de 10 minutos en PBS.
- Lavar con PBS (1 x 10 minutos).
- Incubación en el anticuerpo primario (ver marcadores utilizados, anticuerpos y condiciones en Tablas 2.1 y 2.2). En aquellos casos en los que el anticuerpo estaba desarrollado en ratón, se realizó un paso de bloqueo previo con PBS 0,1M 0,2% de Tritón X-100 y BSA al 5% durante 30 minutos, con el objeto de minimizar reacciones inespecíficas.

2.4.1. Marcaje inmunohistoquímico para microscopía óptica convencional

- Incubar las secciones a 22 °C en agitación continua, en uno de los anticuerpos primarios (Tablas 2.1 y 2.2) diluidos en PBS con 0,2% de Tritón X-100 y 0,1% de azida sódica.
- Lavar con PBS 0,1M (3 x 10 minutos).

¹ Todos los pasos de incubación y de lavados de la técnica inmunohistoquímica que se describen a continuación, se realizaron con agitación constante (agitador de rotación circular Nahita 685 y asimétrico tridimensional Heidolph Polymax 1040).

- Incubar durante 70 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente (Tabla 2.3), a una dilución de 1/500 en el mismo diluyente que el anticuerpo primario.
- Lavar con PBS 0,1M (3 x 10 minutos).
- Incubar en una solución de Estreptavidina (ExtrAvidin®) conjugada a peroxidasa de rábano a 1/2000 en PBS 0,1M con 0,2 % de Tritón X-100 durante 90 minutos.
- Lavar con PBS 0,1M (3 x 10 minutos).
- Para la visualización de la reacción de la peroxidasa, las secciones se incubaron en una solución de revelado, 3-3' diaminobencidina tetrahidroclorhídrico (DAB) al 0,05% en tampón Tris clorhídrico 50 mM, 0,03% de níquel sulfato amónico y peróxido de hidrógeno al 0,03% en PBS (ver apéndice 2.12.6). Este revelado permite la visualización del marcador en color azul oscuro.
- Montar las secciones en portaobjetos gelatinizados y dejar secar.
- Deshidratación y montaje con el medio DPX.

Tabla 2.1. Relación de marcadores estudiados mediante inmunohistoquímica

MARCADOR	CARACTERÍSTICA
β-amiloide	Fragmento peptídico generado por el procesamiento proteolítico de la proteína precursora amiloide (APP) en la vía amiloidogénica. El anticuerpo 6E10 reconoce los primeros 17 residuos aminoácidos del péptido Aβ, y por tanto también reconoce formas precursoras. El anticuerpo 4G8 reconoce el fragmento generado tras el procesamiento de APP que incluye los aminoácidos 17 a 24 de la secuencia del β-amiloide. También reconoce las formas precursoras
Aβ42	Péptido amiloide de 42 aminoácidos. Constituyente principal de las placas extracelulares, ya que tiende a agregarse y generar formas fibrilares.
Aβ oligomérico	Formas oligoméricas del péptido amiloide de pequeño tamaño (12-24 mers). Se ha demostrado que son las especies más neurotóxicas. Para su detección se ha utilizado el anticuerpo OC.
Colinacetil-transferasa (ChAT)	Enzima encargada de la síntesis de acetilcolina. Permite identificar las neuronas y terminales colinérgicos.
APP	Proteína precursora amiloide que tras su procesamiento por las presenilinas da lugar al β-amiloide. El anticuerpo utilizado reconoce el fragmento C-terminal.
Calretinina (CR)	Proteína ligadora de calcio que se expresa en las subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas que inhiben a otras interneuronas.
Catepsina D (CatD)	Es una proteasa lisosomal ácida y, por tanto, se puede usar como marcador de este orgánulo.
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida que forma los filamentos intermedios de células astrogiales. Es un marcador específico de los astrocitos.
Hsp27 (HSPB1)	"Heat shock protein 27". Pequeñas proteínas liberadas en situación de estrés que actúan como chaperonas, ayudando al plegamiento de otras proteínas.
Iba1	Molécula adaptadora (del inglés "ionized calcium binding adapter molecule 1") que se expresa específicamente en microglía y monocitos activados. Suele asociarse con procesos inflamatorios crónicos.
LAMP2	Proteína lisosomal asociada a membrana. Interviene en procesos de autofagia. Es

	un buen marcador de lisosomas.
LC3-b	“ <i>Light chain 3</i> ”. Es una proteína de unión a microtúbulos (MAP) que se puede presentar en dos estados: LC3-a (citósolica, formada por escisión del extremo C-terminal de LC3) o LC3-b (asociada a vesículas autofágicas tras la lipidación de LC3-a. Se considera de autofagia).
MAP-2	“ <i>Microtubule associated protein-2</i> ”. Proteína abundante en el sistema nervioso, que se asocia con la tubulina de los microtúbulos. Además, interacciona con otros elementos del citoesqueleto como son los neurofilamentos y la actina. Marcador dendrítico.
Neurofilamento (NF)	Es una proteína de los filamentos intermedios implicados en el mantenimiento del citoesqueleto neuronal, principalmente en los axones.
Neuropeptido Y (NPY)	Producido por una subpoblación de interneuronas GABAérgicas. Está implicado en la inhibición presináptica de la liberación de neurotransmisores y facilita la retención de memoria. Está presente en una subpoblación específica de interneuronas del hipocampo, y colocaliza mayoritariamente con somatostatina en las células O-LM y HIPP.
NeuN	Marcador específico de núcleos de neuronas maduras de vertebrados.
p75NTR	Receptor de neurotrofina de baja afinidad (<i>Low-Affinity Nerve Growth Factor Receptor</i>). Miembro de la superfamilia de los receptores del factor de necrosis tumoral.
Parvalbúmina (PV)	Proteína ligadora de calcio expresada en determinadas subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas, como las células en cesto.
Sinaptofisina	Glicoproteína ácida que se une a Ca ⁺⁺ , forma parte de la membrana de las vesículas sinápticas. Se utiliza como marcador de sinapsis, al encontrarse en los terminales sinápticos.
Somatostatina (SOM)	Neuropéptido sintetizado por una subpoblación de interneuronas GABAérgicas, como por ejemplo las células OL-M e HIPP del hipocampo y las células de Martinotti en la corteza cerebral.
Tau fosforilada	Tau es una proteína estructural de unión a microtúbulos (MAP). En la EA, su forma hiperfosforilada se encuentra formando acúmulos intracelulares. El anticuerpo AT8 reconoce un epítipo de los filamentos helicoidales pareados de Tau sensible a fosforilación (Ser202/Thr 205), correspondiente a Tau40 humano.
Ubiquitina	Proteína ubicua altamente conservada, que se une a proteínas que van a ser degradadas vía proteasoma (proceso de ubiquitinización).
VGAT	Transportador vesicular GABA. Es una proteína integral de membrana de vesículas sinápticas que contienen neurotransmisores inhibidores, como el GABA. Marcador de sinapsis GABAérgicas.
VGluT1	Transportador Vesicular de Glutamato. Transporta glutamato al interior de las vesículas sinápticas. Marcador de sinapsis glutamatérgicas.
VIP	Péptido intestinal vasoactivo. Es un neurotransmisor, perteneciente a la familia del glucagón generado por una subpoblación de interneuronas GABAérgicas.

Tabla 2.2. Relación de anticuerpos primarios utilizados en los estudios inmunohistoquímicos

ANTICUERPO PRIMARIO	DILUCIÓN DE USO	INCUBACIÓN (TIEMPO Y TEMPERATURA)	ANIMAL DE OBTENCIÓN	REFERENCIA
Anti-Aβ42	1:5000	24 h; 22 °C	Conejo	Abcam; Ref.: 39377
Anti-Aβ oligomérico (OC)	1:5000	24 h; 22 °C	Conejo	Millipore; Ref.: AB2286
Anti-Aβ 1-17	1:5000	24 h; 22 °C	Ratón	Covance; Ref.:

(6E10)				SIG-39320
Anti-Aβ (4G8)	1:2000	24 h; 22 °C	Ratón	Covance; Ref.: SIG-39240
Anti-colin- acetiltransferasa (ChAT)	1:1000	24 h; 22 °C	Cabra	Chemicon; Ref.: AB144P
Anti-APP	1:200000	24 h; 22 °C	Cabra	Meridian life sciences; Ref.: Q2B100G
Anti-APP	1:20000	24 h; 22 °C	Conejo	Sigma; Ref.: A8717
Anti-Calretinina	1:5000	24 h; 22 °C	Conejo	Swant; Ref.: 7699/4
Anti-CatD	1:100	48 h; 22 °C	Cabra	Santa Cruz Biotechnology; Ref.: sc-6494
Anti-GFAP	1:2000	24 h; 22 °C	Pollo	Chemicon; Ref.: AB5541
Anti-GFAP	1:10000	24 h; 22 °C	Conejo	Dako; Ref.: z0334
Anti-Hsp27	1:1000	24 h; 22 °C	Conejo	Sigma; Ref.: HPA000497
Anti-Iba1	1:2000	24 h; 22 °C	Cabra	Abcam; Ref.: ab5076
Anti-Iba1	1:1000	24 h; 22 °C	Conejo	Wako; Ref.: 019- 19741
Anti-LAMP2	1:500	24 h; 22 °C	Conejo	Abcam; Ref.: AB37024
Anti-LC3-b	1:1000	24 h; 22 °C	Conejo	Cell Signaling; Ref.: #2775
Anti-MAP-2	1:5000	24 h; 22°C	Conejo	Chemicon; Ref.: AB5622
Anti- Neurofilamento M (150 KDa)	1:500	72 h; 22 °C	Conejo	Chemicon; Ref.: AB1981
Anti-NPY	1:5000	48 h; 22 °C	Conejo	Sigma; Ref.: N9528
Anti-NeuN	1:1000	24 h; 22 °C	Ratón	Chemicon; Ref.: MAB377
Anti-p75	1:1000	24 h; 22 °C	Conejo	Promega; Ref.: G323A
Anti- Parvalbúmina	1:5000	48 h; 22 °C	Conejo	Swant; Ref.: PV-28
Anti- Sinaptofisina	1:1000	24 h; 22 °C	Conejo	Abcam; Ref.: AB14692
Anti- Sinaptofisina	1:100	24 h; 22 °C	Pollo	Abcam; Ref.: AB130436
Anti-SOM	1:1000	48 h; 22 °C	Cabra	Santa Cruz; Ref.: D-20
Anti-Tau fosforilada (AT8)	1:250	24 h; 4 °C	Ratón	Pierce; Ref.: MN1020
Anti-Ubiquitina	1:5000	24 h; 22 °C	Conejo	Dako; Ref.: Z0458
Anti-VGAT	1:5000	24 h; 22 °C	Cobaya	Calbiochem; Ref.: 676780

Anti-VGluT1	1:10000	72 h; 22 °C	Cobaya	Chemicon; Ref.: AB5905
Anti-VIP	1:5000	48 h; 22 °C	Conejo	AntibodyBcn; Ref.: AC20077

Tabla 2.3. Relación de anticuerpos secundarios utilizados en los estudios inmunohistoquímicos de microscopía óptica de campo claro

ANTICUERPO SECUNDARIO (BIOTINILADO)	DILUCIÓN DE USO	INCUBACIÓN (TIEMPO Y TEMPERATURA)	REFERENCIA
Anti-IgG de cabra desarrollado en caballo	1:500	70 min; 22 °C	Vector Lab.; Ref.: BA-9500
Anti-IgG de cobaya desarrollada en cabra	1:500	70 min; 22 °C	Vector Lab.; Ref.: BA-7000
Anti-IgG de conejo desarrollado en cabra	1:500	70 min; 22 °C	Vector Lab.; Ref.: BA-1000
Anti-IgG de pollo desarrollado en cabra	1:500	70 min; 22 °C	Vector Lab.; Ref.: BA-9010
Anti-IgG de ratón desarrollado en cabra	1:500	70 min; 22 °C	Vector Lab.; Ref.: BA-9200

2.4.1.1. Marcaje inmunohistoquímico doble para microscopía convencional con revelado DAB-Níquel/DAB

- Realizar el protocolo de inmunohistoquímica adecuado según el primer antígeno a detectar.
- Una vez revelado con DAB-Níquel, lavar con PBS 0,1M (3 x 10 minutos).
- Posteriormente incubar con el segundo anticuerpo primario, seguido del correspondiente secundario y Extravidin-peroxidasa, según el protocolo típico para inmunohistoquímica.
- A continuación, revelar con una disolución de DAB 0,05%-Tris clorhídrico y peróxido de hidrógeno al 0,01% en PBS 0,1M. Este revelado permite la visualización del marcador en color marrón.
- Tras otros tres lavados de 10 minutos con PBS 0,1M, montar las secciones en portaobjetos gelatinizados y dejar secar.
- Deshidratación y montaje con el medio DPX.

2.4.1.2. Marcaje inmunohistoquímico múltiple (5x) a microscopía de campo claro para diferenciar células principales de interneuronas.

Cuando se emplea una batería de varios anticuerpos el proceso no difiere mucho del anterior. Para este marcaje múltiple (5x) se han empleado un total de cinco anticuerpos primarios: los anticuerpos anti-SOM, anti-PV, anti-VIP y anti-CR (característicos de neuronas GABAérgicas) y el anticuerpo anti-NeuN (que marca los núcleos de todas las neuronas). Esta combinación permite diferenciar las células principales glutamatérgicas (marcadas sólo con el anticuerpo para NeuN) de las interneuronas GABAérgicas

(marcadas con NeuN y además con uno o varios de los otros cuatro anticuerpos primarios). Se eligió este complejo procedimiento experimental, en lugar del clásico inmunomarcaje con anticuerpos contra GABA o GAD67 para el marcaje de todas las interneuronas, porque observamos que el número de somas inmunopositivos para estos marcadores siempre era menor que el número de somas detectados empleando anticuerpos contra SOM o PV, que son subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas. Estas diferencias entre los distintos inmunomarcajes, que también han sido observadas por otros autores (Wouterlood y Pothuizen, 2000), puede deberse a la distinta preservación del antígeno que reconocen los anticuerpos en el tejido, la penetración del anticuerpo, la localización intracelular del epítipo (en el cuerpo celular o en los botones axonales) o simplemente debido a que las interneuronas GABAérgicas no son uniformes en cuanto a los niveles de GABA o GAD67.

En el día 1, se realizaron los bloqueos de peroxidasa endógena y de avidina/biotina y se procedió a la incubación secuencial con los anticuerpos primarios específicos para interneuronas que expresan SOM, PV, CR y VIP, de uno en uno, cubriendo así casi todos los tipos de interneuronas según su contenido neuroquímico (Miyoshi y col., 2007). Cada anticuerpo primario se incubó una noche. Tras las 24 horas de incubación del anticuerpo contra SOM, los cortes se lavaron con PBS 0,1M (10 minutos, 3 veces) y, a continuación, se pasó a la incubación del anticuerpo anti-PV, y así consecutivamente con anti-CR y anti-VIP, hasta el día 4. Tras la incubación con este último anticuerpo primario, en el día 5, se procedió a la incubación con los anticuerpos secundarios biotinilados específicos para los respectivos anticuerpos primarios (anti-cabra para SOM y anti-conejo para los otros tres), seguido de la incubación en estreptavidina-peroxidasa y revelado con DAB-Ni. De este modo se consigue que las interneuronas presenten un marcaje azulado en el soma y sus prolongaciones.

Tras el revelado, se procedió al lavado de los cortes en PBS (3 x 10 minutos) y la incubación con el anticuerpo anti-NeuN durante tres noches a 4 °C, hasta el día 8. Posteriormente, el día 9, se incubaron los cortes en el anticuerpo secundario biotinilado específico (anti-ratón) y en la estreptavidina-peroxidasa, seguido del revelado del producto de inmunorreacción, esta vez únicamente con DAB. Así, se consigue que todas las neuronas maduras posean un marcaje nuclear de color marrón. De este modo, las interneuronas tendrán un doble marcaje (azul en el citoplasma y marrón en el núcleo), mientras que el resto de las neuronas (las células principales) presentarán sólo un marcaje nuclear marrón (Fig. 2.12). Finalmente, las secciones se montaron y se deshidrataron como se ha mencionado en el apartado anterior.

Se procesaron los controles apropiados para evitar cualquier falso positivo debido a la reactividad cruzada entre los sistemas de revelado (omisión de los anticuerpos primarios). Para una discriminación inequívoca de las diferentes reacciones de estreptavidina-peroxidasa, la primera (para interneuronas) fue siempre realizada con DAB-níquel (azul), mientras que la segunda (NeuN) se realizó sólo con DAB (marrón claro).

Además, la diferente localización espacial (compartimento celular) de los epítopes para interneuronas (citoplasma) y NeuN (núcleos) garantizaba completamente la correcta visualización no solapada de ambas reacciones y, por tanto, la interpretación de los resultados.

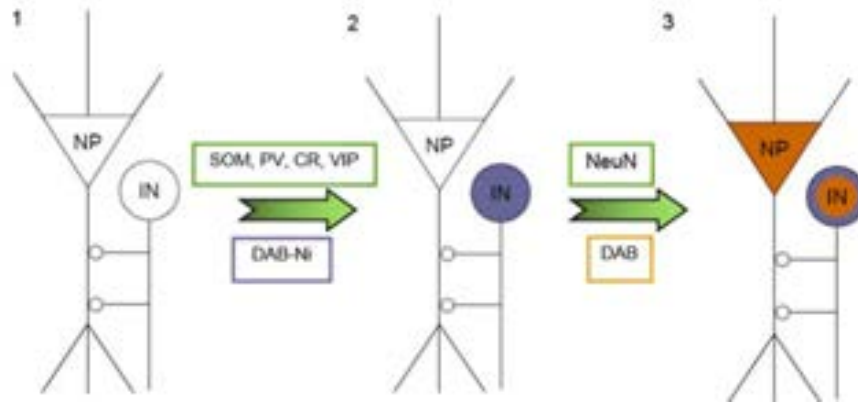


Figura 2.12. Esquema de la inmunohistoquímica múltiple para el marcaje diferencial de interneuronas y células principales del subículo a microscopía convencional de campo claro. De izquierda a derecha: 1.- Representación de los tipos neuronales sin procesar (NP: Neurona principal; IN: interneuronas). 2.- Las interneuronas se marcan en azul tras el revelado con DAB-Ni de los anticuerpos específicos para el contenido neuroquímico de las interneuronas (SOM, PV, CR y VIP). 3.- Finalmente, tanto las interneuronas como las neuronas principales se marcan en marrón con NeuN tras revelar con DAB, quedando las células principales con marcaje nuclear marrón y las interneuronas con doble marcaje.

2.4.2. Marcaje inmunohistoquímico doble/triple para microscopía de fluorescencia

Para los estudios de colocalización a microscopía confocal de distintos marcadores, se realizaron diversas combinaciones de anticuerpos primarios, evidenciadas con anticuerpos secundarios y/o estreptavidina acoplados a fluorocromos (Fig. 2.13).

- Se llevó a cabo el protocolo general de inmunohistoquímica comentado anteriormente hasta la incubación del anticuerpo primario.
- A continuación se lavó con PBS (3 x 10 minutos).
- Posteriormente se incubó en el segundo anticuerpo primario durante el tiempo correspondiente al mismo.
- Lavar con PBS (3 x 10 minutos).
- En el caso de una inmunohistoquímica triple de fluorescencia se incubó en el tercer anticuerpo primario.
- Se lavó con PBS (3 x 10 minutos).
- Se procedió a incubar en el primer anticuerpo secundario para el primer anticuerpo primario acoplado al fluorocromo Alexa 568 (1/1000)² (Tabla 2.4) durante 1 hora.
- Lavar con PBS (3 x 10 minutos).

² En este paso se puede incubar en un anticuerpo secundario biotilado en lugar de incubar con un secundario acoplado a un fluorocromo, para posteriormente proceder a la incubación de la streptavidina fluorescente (Tabla 2.5; ver Fig. 2.13).

- Incubar durante 1 hora con un anticuerpo secundario Alexa 488 (1/000) (Tabla 2.4) para el segundo anticuerpo primario.

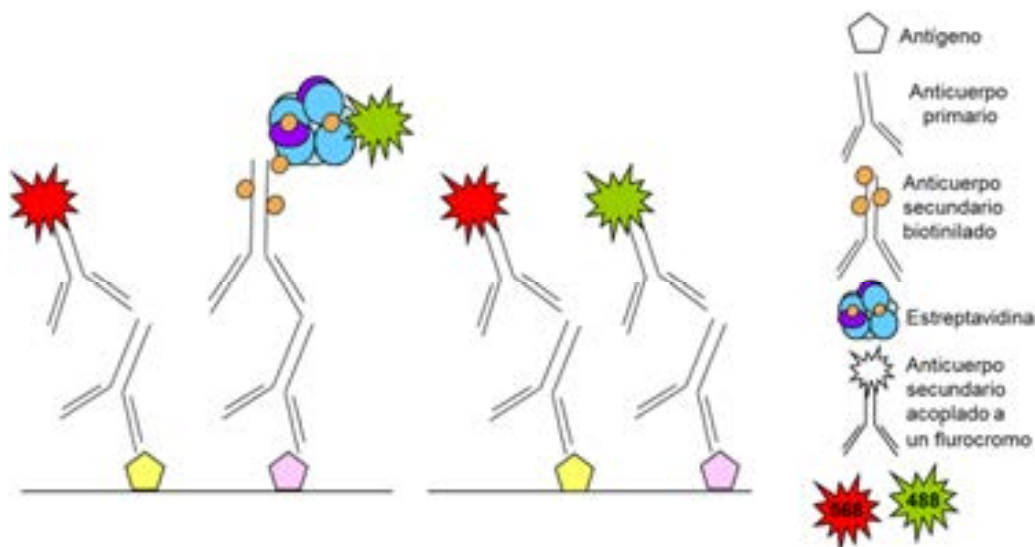


Figura 2.13. Esquema de la inmunohistoquímica doble para microscopía de fluorescencia. En el esquema se muestran las dos combinaciones que se han empleado en los dobles marcajes fluorescentes. A la izquierda, empleando un anticuerpo secundario acoplado a un fluorocromo para uno de los anticuerpos primarios y un anticuerpo secundario biotilado y estreptavidina acoplada a un fluorocromo distinto para el otro anticuerpo primario. A la derecha, empleando para ambos primarios dos anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos distintos.

- Lavar con PBS (3 x 10 minutos).
- En el caso de una inmunohistoquímica triple, el tercer anticuerpo secundario fue biotilado. Se incubó durante 1 hora y 10 minutos. A continuación, se lavó con PBS (3 x 10 minutos) y se procedió a incubar en la estreptavidina fluorescente (Alexa 405, 1/1000) durante 1 hora. Seguidamente se lavó con PBS (3 x 10 minutos).
- Montar las secciones en portaobjetos gelatinizados, usando DABCO como medio de montaje (ver apéndice 2.12.8).
- Visualización al microscopio confocal Leica SP5.

Tabla 2.4. Relación de anticuerpos secundarios utilizados en los estudios inmunohistoquímicos de microscopía de fluorescencia

ANTICUERPO SECUNDARIO	ANIMAL DE OBTENCIÓN	DILUCIÓN DE USO	INCUBACIÓN (TIEMPO Y TEMPERATURA)	REFERENCIA
Anti-IgG de cabra unido a Alexa 488	Burro	1:1000	1 h; 22 °C	Life technologies; Ref.: A-11055
Anti-IgG de cabra unido a Alexa 568	Burro	1:1000	1 h; 22 °C	Life technologies; Ref.: A-11507
Anti-IgG de conejo unido a Alexa 488	Burro	1:1000	1 h; 22 °C	Life technologies; Ref.: A-11008
Anti-IgG de conejo unido a Alexa 568	Burro	1:1000	1 h; 22 °C	Life technologies; Ref.: A-10042
Anti-IgG de pollo	Burro	1:1000	1 h; 22 °C	Life technologies;

unido a Alexa 488				Ref.: A-21202
Anti-IgG de ratón unido a Alexa 568	Burro	1:1000	1 h; 22 °C	Life technologies; Ref.: A-10037

Tabla 2.5. Complejos de estreptavidina conjugada a fluorocromo. Se indica la dilución de uso, las longitudes de onda de los máximos de absorción/emisión y la referencia de la casa comercial.

COMPLEJO (FLUOROCROMO)	DILUCIÓN DE USO	ABSORCIÓN (nm)	EMISIÓN (nm)	REFERENCIA
Estreptavidina-Alexa405	1:1000	402	421	Life technologies, S-32351
Estreptavidina-Alexa488	1:1000	495	519	Life technologies, S-32354
Estreptavidina-Alexa568	1:1000	578	603	Life technologies, S-11225

2.4.3. Controles de la técnica inmunohistoquímica

Como controles negativos de las técnicas inmunohistoquímicas, en cada experimento se procesaron simultáneamente secciones en las que se omitió el paso de incubación en el anticuerpo/s primario/s correspondiente/s, sustituyendo este paso por una incubación en el medio de dilución. En ningún caso, los controles negativos presentaron inmunotinción, demostrando la especificidad de la técnica. En todos los diseños experimentales inmunohistoquímicos se procesaron conjuntamente secciones de ejemplares de los diversos genotipos y/o tratamientos (en su caso) y edades, de manera que se minimizaba, así, cualquier variación en la intensidad del inmunomarcaje.

2.5.

Obtención de imágenes microscópicas

2.5.1. Imágenes para microscopía convencional de campo claro

Las imágenes de inmunohistoquímica de DAB, DAB-níquel o de tinciones histológicas generales se obtuvieron con un microscopio convencional Nikon modelo

Eclipse 80i, acoplado a una cámara fotográfica digital Nikon DS-5M de 5 mega píxeles. Ésta, estaba conectada con el programa ACT-2U (*Auto Camera Tame To You*; Imaging Software, Nikon Corporation 2004). Las imágenes fueron obtenidas a un tamaño de 2560x1920 en formato jpg.

2.5.2. Imágenes para microscopía de fluorescencia

Las imágenes de epifluorescencia se tomaron con un microscopio Olympus BX61, que posee una fuente de fluorescencia (Olympus U-RFL-T) con filtros FITC (verde) y TRITC (rojo), empleando el programa de captura de imágenes Cell-A (Olympus).

Las imágenes de fluorescencia a microscopía confocal fueron obtenidas con el microscopio láser confocal Leica SP5 (Servicios Centrales de la Universidad de Málaga), conectado a un ordenador. Se trata de un microscopio óptico convencional al que se le acopla un rayo láser como fuente de iluminación, y un sistema electrónico que permite la captación de imágenes digitales. Se obtienen secciones ópticas extremadamente finas, siendo el plano focal de 0,4 μm , determinado por un *pinhole* de 0,8-1, que permite la eliminación de interferencias de otras fuentes de luz. Entre otras aplicaciones, este sistema permite conocer la colocalización de dos o más moléculas en una misma célula. Finalmente, se adquieren fotos digitales de tamaño 1024x1024 en formato tiff. El procesamiento de estas imágenes se realizó con el programa LAS AF Lite 2.1.1. (*Leica*).

2.5.3. Procesamiento de imágenes

Las imágenes digitales fueron procesadas con el programa informático Adobe PhotoShop CS (7.0), modificándose el tamaño y el brillo/contraste de toda la imagen completa, en aquellas ocasiones en las que fuera necesario. Posteriormente, se montaron en láminas con el programa Microsoft Office PowerPoint.

2.6.

Microscopía electrónica de transmisión (MET)

2.6.1. Fijación y conservación

La fijación para MET se llevó a cabo de la misma manera que se ha descrito en el apartado 2.2.1. Una vez realizada la postfijación en PLP durante una noche, los cerebros se pasaron por 3 lavados de 10 minutos cada uno con tampón PBS para eliminar el exceso de fijador y se almacenaron en esta solución a 4 °C hasta su posterior procesamiento.

2.6.2. Obtención de las secciones

Para obtener las secciones de los cerebros conservados en PBS a 4 °C, es necesario encastrarlos previamente en agarosa al 3% en PBS 0,1M (ver apéndice 2.12.9). El corte se realizó en el plano coronal con un vibratomo (Leica, VT1000S) con el fin de evitar todas aquellas alteraciones que el proceso de congelación pudiera producir. Los distintos cortes obtenidos se recogieron en placas multipocillos que contenían PBS 0,1M y 0,02% azida sódica. Cada cerebro se cortó en su totalidad en secciones de 250 µm. Las placas con las secciones obtenidas se almacenaron a 4 °C hasta su posterior uso (inclusión en resina y obtención de cortes semifinos y ultrafinos).

2.6.3. Deshidratación e inclusión en plano

Una vez obtenidas las secciones en vibratomo, los cortes que contenían la región de interés se procesaron para su visualización posterior en el microscopio electrónico de transmisión (MET).

Tras un lavado intenso en PBS, los cortes de vibratomo fueron postfijados, deshidratados e incluidos en resina, según el siguiente protocolo (ver apéndice 2.12.9):

- | | |
|---|------------|
| - Postfijación: | 1 h 30 min |
| incubación en tetraóxido de osmio 1% en PBS 0,1M a 4 °C | |
| - Lavados en PBS 0,1M | 3x10 min |
| - Deshidratación y contraste en bloque: | |
| Acetona 30% | 30 min |
| Acetona 50% | 30 min |
| Acetona 70% + Acetato de Uranilo 1% | 1 hora |
| Acetona 80% | 30 min |
| Acetona 90% | 30 min |
| Acetona 100% | 2x30 min |
| - Mezcla acetona-resina (1:1) | 1 hora |
| - Pasar las secciones a resina pura a temperatura ambiente | 2 horas |
| - A continuación, y con sumo cuidado, se colocan 2 o 3 piezas de tejido entre dos portaobjetos forrados con papel de aluminio y se añade una pequeña cantidad de resina pura. Se presionan con cuidado los dos portaobjetos para eliminar las posibles burbujas que se hayan podido formar y todo ello se introduce a 60 °C en una estufa durante 24-48 horas para permitir la correcta polimerización de la resina. Con este sencillo método conseguimos obtener las secciones de tejido incluidas en plano. | |

2.6.4. Montaje y tallado de las secciones en bloques de resina

Tras la polimerización, separamos los dos portaobjetos y nos queda una fina lámina de resina en la que tenemos las secciones incluidas. A continuación, con unas tijeras, se separan cada una de las secciones de la lámina de resina y se pega con pegamento de secado rápido a un bloque de resina polimerizada, dejando secar a temperatura ambiente antes de realizar el tallado del bloque.

Una vez tenemos el bloque de resina con la muestra de tejido bien pegada, se monta todo en el soporte del ultramicrotomo en el cual vamos a realizar el tallado. Para ello usamos una cuchilla bien afilada y vamos retirando poco a poco distintas porciones tanto de resina como de tejido superfluo. El objetivo final de este procedimiento es obtener un bloque de resina en el cual tengamos una pirámide de base trapezoidal cuya cara superior sea toda la región de interés para nuestro estudio. El tamaño de la superficie de la muestra dependerá del tipo corte que se vaya a realizar, semifinos para microscopía óptica o ultrafinos para microscopía electrónica, siendo en este último caso muy pequeña (0,5 mm² aproximadamente).

2.6.5. Ultramicrotomía

Las muestras de tejido incluidas en resina, y preparadas tal y como se ha detallado anteriormente, han de ser cortadas para obtener los cortes semifinos y ultrafinos mediante el uso de un ultramicrotomo (Modelo Ultracut E, Reichert-Jung).

Se realizan, en primer lugar, cortes semifinos (1 μm de grosor) que se tiñen con el colorante azul de toluidina (ver apéndice 2.12.10) para su observación al microscopio óptico. Con ello lo que perseguimos es la determinación del área final de interés que vamos a volver a tallar antes de realizar los cortes ultrafinos.

Los cortes ultrafinos para MET se realizaron con un grosor de 50-90 nm y se pasaron directamente de la balsa de la cuchilla a rejillas de níquel de 100 agujeros. También se realizaron algunos cortes semifinos de la misma superficie sobre la que se hicieron los ultrafinos, para su tinción posterior con azul de toluidina y para la obtención de fotografías con las que poder guiarnos durante la observación en el microscopio electrónico de transmisión.

2.6.6. Protocolo general de la técnica inmunohistoquímica para MET

- Lavado en PBS 0,1 M para eliminar los restos de azida sódica (3 x 10 minutos).
- Solo en aquellos casos en que sea requerido por el anticuerpo primario (ver Apdo. 2.4), se realizará un pretratamiento con ácido fórmico o con citrato, tras el cual se volverá a lavar con PBS 0,1 M (3 x 10 minutos).
- Incubar las secciones en una solución de glicina 50 mM en PBS 0,1 M durante 5 minutos, a temperatura ambiente y con agitación, para romper los grupos aldehídos del fijador y facilitar la penetración del anticuerpo en el tejido.
- Lavar con PBS 0,1 M (3 x 10 minutos).
- Para aumentar la penetración del anticuerpo, se realiza un proceso de congelación/descongelación mediante el que se permeabilizan las membranas celulares pero sin llegar a alterar la morfología de la célula a nivel ultraestructural. Para ello:
 - Incubar las secciones en solución de crioprotección al 100% durante 20 minutos a temperatura ambiente.
 - Volver a incubar las secciones en la misma solución crioprotectora durante 20 minutos a -80°C .
 - Tras dejar atemperar las secciones, se incuban ahora en una serie de soluciones de crioprotección (diluidas en PBS; ver apéndice 2.12.9) a un porcentaje decreciente y a una temperatura ambiente:
 - Solución crioprotección al 100%. 10 minutos.
 - Solución crioprotección al 70%. 10 minutos.
 - Solución crioprotección al 50%. 10 minutos.

- Solución crioprotección al 30%. 10 minutos.
- Lavar con PBS 0,1 M (1 x 10 minutos).
- Incubar las secciones en la “solución de bloqueo 1” (PBS 0,1 M/Tx-100 0,01%/azida sódica 0,1%/BSA 1%; ver apéndice 2.12.9) a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Incubar las secciones con el anticuerpo primario (utilizando como diluyente la solución de bloqueo anterior) durante 48 horas (Anticuerpos Tabla 2.3).
- Lavar con PBS 0,1 M (3 x 10 minutos).
- Incubar las secciones en la “solución de bloqueo 2” (PBS 0,1 M/BSA 0,8%/gelatina de pescado 0,1%; ver apéndice 2.12.9) durante 30 minutos.
- Incubar las secciones en el anticuerpo secundario (Tabla 2.6) conjugado con partículas de oro de 1,4 nm (NANOGOLD), diluido a 1/100 en la “solución de bloqueo 1” (PBS 0,1 M/Tx-100 0,01%/azida sódica 0,1%/BSA 1%) durante 1 noche a temperatura ambiente.
- Lavar con la “solución de bloqueo 2” (PBS 0,1 M/BSA 0,8%/gelatina de pescado 0,1%) (3 x 5 minutos).
- Lavar con PBS 0,1 M (3 x 5 minutos).
- Postfijar las secciones con glutaraldehído (2%) en PBS 0,1 M durante 10 minutos.
- Lavar con agua destilada (2 x 3 minutos).
- Lavar con citrato sódico 0,02 M, pH 7,0 (3 x 5 minutos).
- Preparar el kit HQ SILVER™ (intensificador de la marca) usando cantidades iguales de cada uno de los tres componentes. Mezclar el mismo volumen de la solución A (iniciador) y B (moderador). A continuación, añadir la misma cantidad de la solución C (activador). Revelar durante 5-10 minutos³.
- Lavar en agua destilada (2 x 3 minutos).
- Lavar en PB 0,1 M (1 x 10 minutos).
- *Gold toning*: Sustituye a las partículas de plata manteniendo la amplificación de su tamaño y evitando su eliminación por el posterior tratamiento por el osmio, ya que el oro no se ve alterado por el tratamiento con osmio.
 - Cloruro de oro 0,05% en agua destilada en oscuridad y a 4 °C durante 10 minutos.
 - Tiosulfato sódico 0,3% en agua destilada en oscuridad y a 4 °C (2 x 10 minutos).
- Lavar en PB 0,1 M (3 x 10 minutos).
- Incubar las secciones en una solución del 1% de tetraóxido de osmio (4%) en tampón PBS a 4 °C y oscuridad durante 45 minutos.

³ El kit de plata se inactiva con la temperatura, por ello, en función del calor del laboratorio, se dejará un tiempo de incubación diferente que oscila entre los 5-10 minutos. En ningún caso, se dejará más de 11 minutos aproximadamente.

- Lavar en PBS 0,1 M (2 x 10 minutos).
- Deshidratación de las secciones e inclusión en plano (Apdo. 2.6.3).

Tabla 2.6. Relación de anticuerpos secundarios acoplados a oro utilizados en los estudios inmunohistoquímicos de MET

ANTICUERPO SECUNDARIO	ANIMAL DE OBTENCIÓN	DILUCIÓN DE USO	INCUBACIÓN (TIEMPO Y TEMPERATURA)	REFERENCIA
Anti-IgG de conejo acoplado a oro	Cabra	1:100	24 h; 22 °C	NanoProbes; Ref.: 2004

2.6.7. Observación y obtención de las imágenes

La observación de los cortes ultrafinos se realizó en un microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM-1400) de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Málaga. Este mismo microscopio electrónico se utilizó para la obtención de las imágenes digitales.

2.7.

Cuantificación mediante estereología

La estereología es una rama de la morfometría que permite la adquisición de información tridimensional y cuantitativa a partir de imágenes bidimensionales, como es el caso de secciones de tejido (Mayhew, 1986; 1992). Constituye un conjunto de métodos simples que combina la probabilidad geométrica y la estadística para la cuantificación de características geométricas tridimensionales de objetos, como el volumen, área, longitud, número y conectividad (Howard y Reed, 1998). Son métodos no sesgados, carentes de error sistemático y la estimación de los parámetros no está influida ni por la forma del objeto, ni por su distribución y/o tamaño, lo que constituyen grandes ventajas metodológicas. Además, con una muestra muy pequeña de sujetos y pocas secciones (6-7

secciones) se obtienen coeficientes de error y de variación aceptablemente bajos (Royet, 1991).

Para la cuantificación de diferentes poblaciones pueden utilizarse dos aproximaciones estereológicas: el fraccionador óptico (West y col., 1991) que permite obtener una estimación del número total de entidades de una estructura, y por otra parte, la determinación de la densidad con el disector óptico (Jinno y col., 1998; 2003; 2006), la utilización de este estimador conllevó la determinación del factor de encogimiento que presenta la región a estudiar. Con ambos estimadores se emplea el mismo sistema de computación, que comprende un microscopio convencional (Olympus BX61), una cámara digital (Olympus DP71), el programa informático NewCAST (Computer Assisted Stereological Toolbox, Olympus) con el sistema VIS 2.61.1.0 (Visiopharm Integrator System, Visiopharm®) y un microcator (Prior ProScan), que monitoriza los movimientos del eje z con una resolución de 0,5 μm (ver Fig. 2.14).

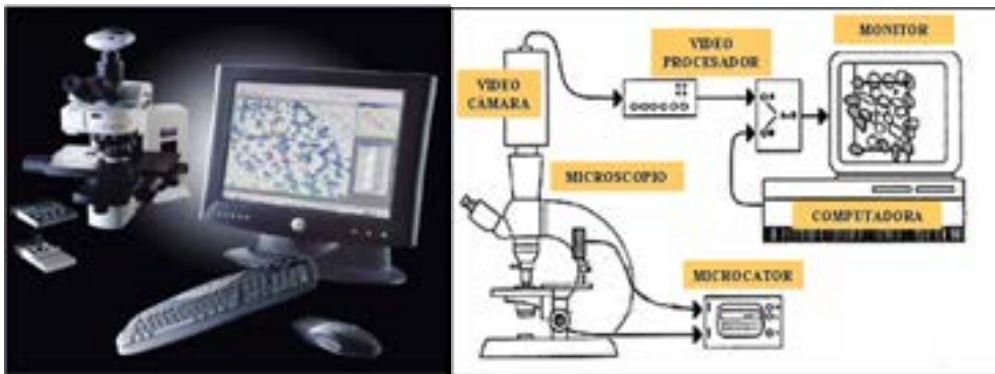


Figura 2.14. Imagen y esquema representativo de los distintos componentes del sistema de análisis estereológico C.A.S.T.

Aproximadamente por cada cerebro se analizaron 7-10 secciones seriadas, de uno de los hemisferios cerebrales, separada una de otra 280 μm , obteniendo de esta manera una representación de toda la zona de estudio, desde regiones rostrales hasta las caudales. Se empleó una media entre 3-6 animales de cada genotipo y/o tratamiento y edad para realizar las distintas estimaciones. El área estudiada fue seleccionada utilizando el objetivo de 10x/0.40, mientras que el muestreo se realizó con el objetivo de inmersión 100x/1.35.

A continuación se detallan los parámetros, y la aproximación estereológica utilizada, para cada uno de los marcadores celulares estudiados.

2.7.1. Fraccionador óptico

El fraccionador óptico es un estimador que resulta de la combinación del disector óptico y un muestreo sistemático de las secciones (el fraccionador) (West y col., 1991; Schmitz y Hof, 2005). En este estimador, el conteo de partículas se lleva a cabo por el disector óptico, además requiere que las secciones sean uniformes y muestreadas sistemáticamente, puesto que van a constituir una fracción de la región a ser analizada. El

fraccionador óptico no se ve afectado por los encogimientos que pueda sufrir el tejido y puede ser utilizado para secciones congeladas, en vibratomo y en parafina. La fórmula del fraccionador óptico se compone de los siguientes parámetros:

$$\hat{N} = \frac{1}{ssf} \times \frac{1}{asf} \times \frac{1}{hsf} \times Q$$

ssf: fracción muestreada de las secciones (Fig. 2.15).
 hsf: fracción muestreada en altura (Fig. 2.16).
 asf: fracción muestreada de área (Fig. 2.17).
 Q: número de partículas contadas por individuo.

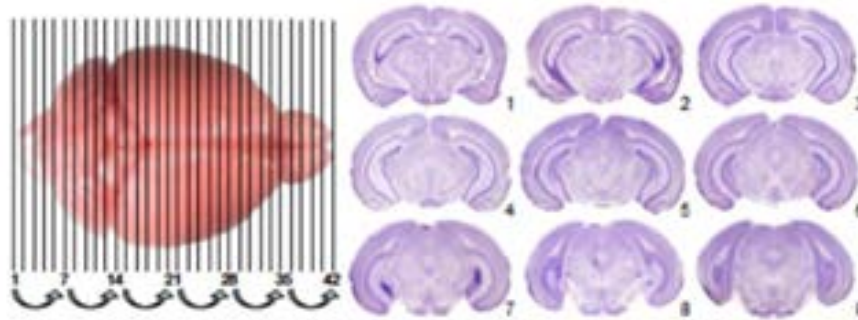


Figura 2.15. ssf: fracción muestreada de las secciones. La fracción muestreada de las secciones es la proporción entre las secciones analizadas y el número total de secciones por animal (n secciones). En este caso 1/7. Las secciones analizadas son muestreadas de forma sistemática (Howard y Reed, 1998).

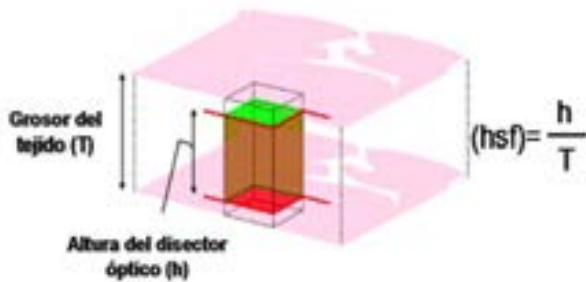


Figura 2.16. hsf: fracción muestreada de altura. La fracción muestreada de altura, es la razón entre la altura de la ventana de conteo (disector óptico) y la altura de la sección de tejido. Las distancias tanto del disector como el de la sección se calcularon con el microcator (Howard y Reed, 1998).

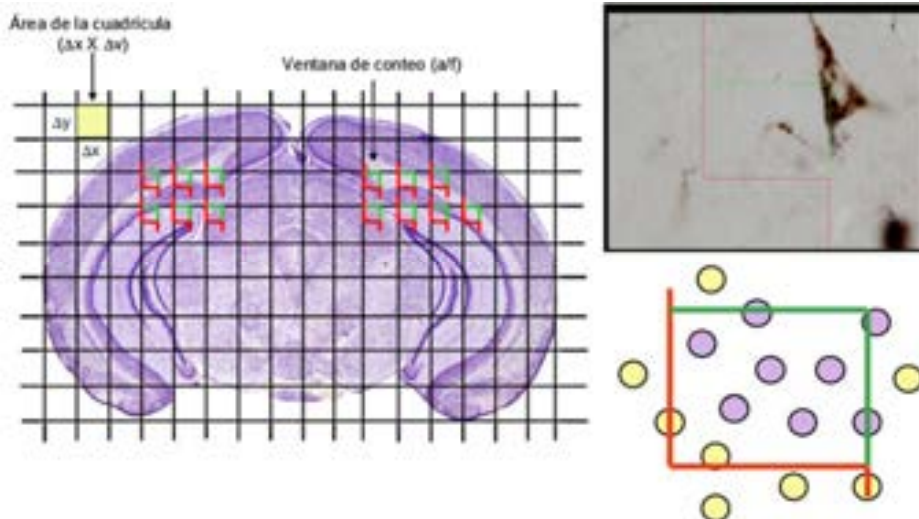


Figura 2.17. asf: fracción muestreada de área. La fracción muestreada de área, es el cociente entre el área de la ventana de conteo (área del disector óptico) y el área de la cuadrícula. En el muestreo sistemático, la cuantificación no se realiza en todo el tejido sino que se contarán el número de partículas que se encuentren contenidas en disectores ópticos (áreas específicas de tejido), que se hayan distribuidos sistemáticamente en una plantilla previamente diseñada (Howard y Reed, 1998). Las partículas contadas son las situadas dentro de la rejilla o las que cortan las líneas de inclusión (partículas en lila), mientras que las situadas fuera de la rejilla o en contacto con las líneas de exclusión o sus extensiones quedan sin contar (partículas amarillas).

2.7.2. Densidad numérica

En el presente trabajo se ha realizado el recuento de diferentes poblaciones neuronales (SOM, NPY, NeuN, ChAT, PV, entre otras) empleando la técnica estereológica del disector óptico, dado como densidad numérica (DN) en número de neuronas por volumen (células/mm³). El uso del disector óptico como procedimiento de muestreo está considerado como el mejor método para una estimación precisa de la densidad numérica de células.

El programa informático NewCAST requiere que los objetos bajo investigación (en nuestro caso células inmunomarcadas) sean muestreados de manera uniforme, es decir, en un área determinada cada objeto debe tener la misma probabilidad de ser contado. Se delimita el área de la región a medir y se determina el porcentaje de la muestra que se quiere estudiar (entre el 10 y 50% del total) y el programa realiza un muestreo de la zona seleccionada al azar, en regiones equidistantes (el primer punto seleccionado es al azar y los consecutivos se marcan con una distancia preseleccionada), mediante el comando *meander sampling* o muestreo en forma de meandro. El área se selecciona manualmente con el objetivo de 4x ó 10x, dependiendo de la facilidad para delimitar la zona, y el muestreo se realiza con el objetivo de 100x de inmersión. Para cada animal se midieron una media de 6-8 secciones seriadas, cada una separada por 280 μm (ya que se muestrea una fracción de 1/7 y los cortes tiene 40 μm de grosor), pertenecientes a un hemisferio cerebral, obteniendo así una representación global a lo largo del eje rostro-caudal (Fig. 2.15).

Para la estimación de la densidad numérica, el programa emplea cuadrículas o ventanas, denominadas *counting frames* o ventanas de conteo, con un área de 902,52 μm^2 , en combinación con el método del disector óptico, que es un método de estimación del número de perfiles somáticos en un volumen de referencia de la muestra, que en este caso fue de 10 μm de grosor por el área de la ventana de conteo. Se delimitó un área de guarda de 3 μm por encima y por debajo del volumen de referencia. Las cuadrículas se distribuyeron de forma equidistante escaneando entre un 10 y un 40% de la muestra según el caso. Teniendo en cuenta los límites de inclusión y exclusión de la cuadrícula (Fig. 2.17), se realizó el conteo de aquellos somas inmunomarcados dentro del volumen seleccionado; así, se tienen en cuenta sólo los somas que se encuentran dentro de los disectores que forman parte de la plantilla, mientras que aquellos que no se encuentran en los disectores no son cuantificados. Se evita, por tanto, el sesgo de que el experimentador seleccione las áreas de tejido en las que aparezca la mayor densidad de partículas o aquellas que mejor se visualicen, ya que el conteo depende del lugar en el que se encuentren los disectores. Además, el muestreo sistemático no provoca la sobreestimación numérica, pues evita que un mismo campo sea cuantificado en repetidas ocasiones, como podría suceder con el muestreo al azar (Royet, 1991).

Teniendo en cuenta el área de la región marcada, la altura en el eje z, el grosor del corte y el número de perfiles somáticos contados, se puede determinar el número de neuronas por unidad de volumen o densidad numérica (DN), según la ecuación:

$$DN = \frac{\sum Q}{\sum A \times h}$$

donde Q es el número de somas; A es el sumatorio de las áreas, es decir, el área de la ventana de conteo (902,52 μm^2) por el número de ventanas cuantificadas, y h es la altura del disector (10 μm), resultando un volumen de referencia de 9025,2 μm^3 . Así, se obtiene la densidad numérica de cada una de las secciones de cada animal, se realiza su media y se muestran los resultados en células/mm³. Posteriormente, se realizó la media entre los animales de cada grupo de edad y genotipo y se presentó junto a su desviación estándar.

2.7.3. Nucleador: tamaño de placas

La isotropía se define como la uniformidad en la distribución a lo largo de todas las posibles orientaciones en 2D o 3D. En la práctica se combina siempre con la posición uniformemente aleatoria de los elementos de test en el espacio, de manera que el diseño del protocolo de medición sobre una estructura garantice el encuentro isotrópico al azar (IUR, del término inglés *Isotropic Uniform Random*) entre la sonda de medida y la estructura. En algunos casos, como la esfera, la propia estructura es estadísticamente isotrópica.

El nucleador se basa en la generación de rayos isotrópicos desde un punto fijo definible (no arbitrario) interior del objeto a medir (por ejemplo, una célula o un depósito amiloide), o bien desde un punto generado UR en el interior de un subespacio discreto (por ejemplo, un nucléolo). Si las secciones son IUR, entonces las direcciones de los rayos deben ser isotrópicas en 2 dimensiones (2D).

La orientación de una línea viene dada por el ángulo ω que forma relativo a un eje predeterminado, y por lo tanto, por el punto en que corta a una circunferencia imaginaria, que a su vez, representa un ángulo. Es preciso que todos los ángulos tengan igual probabilidad de ocurrir. De modo que para lograr la isotropía en 2D hay que generar al azar un número de ángulos uniformemente distribuido entre 0° y 180° (Fig. 2.18A).

En la cuantificación del tamaño de las placas marcadas con Tioflavina S, se empleó el método estereológico. La medida de las placas se realizó en un 20% de la región a estudiar, empleando un tamaño de disector óptico de 6022,8 μm^2 y el objetivo de 40x. El área se determinó empleando el nucleador (2D IUR, *bidimensional isotropic uniform random*), que permite estimar áreas de perfiles. Se trata de líneas radiales (5 en nuestro caso) que permiten determinar el centro y los límites de las placas, obteniéndose su área en μm^2 (Fig. 2.18B). Posteriormente, las placas se agruparon por categorías de tamaño y se representaron gráficamente.

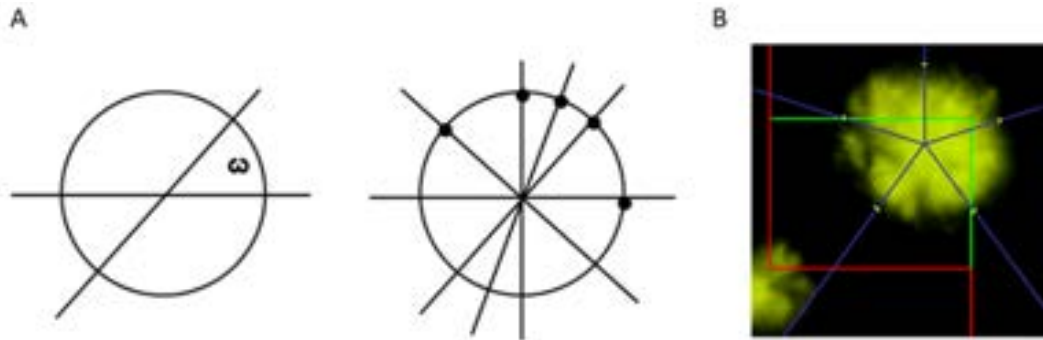


Figura 2.18. Cuantificación del área de las placas mediante el nucleador. A) Principio de isotropía en el que se basa la técnica del nucleador. B) Mediante esta metodología, se cuantifican las placas incluidas en los disectores. Para la medida del área se marca el centro de la placa y el punto de corte de los 5 radios con el borde de la misma.

Finalmente, para determinar el número de placas por unidad de área, se cuantificó el número de placas marcadas con Tio-S mediante estereología, empleando una fórmula similar a la empleada para la densidad numérica, aunque sin tener en cuenta la altura del disector, debido al gran grosor de algunas placas:

$$N^{\circ} / mm^2 = \frac{\sum Q}{\sum A}$$

donde Q es el número de placas marcadas con Tioflavina S y A es el sumatorio de las áreas, es decir, el área de la ventana de conteo ($6022,8 \mu m^2$) por el número de ventanas cuantificadas. Así, se obtuvo el número de placas por área de cada sección del animal, se separaron por rango ($<200 \mu m^2$, $200-500 \mu m^2$, $500-2000 \mu m^2$ y $>2000 \mu m^2$) y se representó la media obtenida junto a la desviación estándar.

2.8.

Cuantificación mediante análisis de imagen

2.8.1. Estudio de la carga amiloide: *plaque loading*

Las secciones teñidas con Tioflavina S o Abeta42 fueron fotografiadas utilizando un microscopio Olympus BX61 empleando el programa de captura de imágenes Cell-A (Olympus), o usando el microscopio Nikon modelo Eclipse 80i con el programa ACT-2U-respectivamente, como se ha descrito en los apartados 2.5.2 y 2.5.1, manteniendo la misma intensidad de luz y sin variar ni el brillo ni el contraste, con el objetivo de 4x. Se analizaron una media de 6-7 secciones para cada animal PS1/APP analizado (n=5/edad), de cada una de las edades (2, 4, 6, 12 y 18 meses).

Las imágenes seleccionadas fueron calibradas en el programa Visilog 6.3 (Noesis, Francia) y se delimitó el área de interés a cuantificar. Esta imagen se binarizó determinando siempre el mismo umbral, establecido en 128 de un rango que oscila entre 0 y 255, de esta manera sólo aparecerían visibles en la pantalla (siendo así cuantificables) las zonas teñidas. Se realizó la suma del área seleccionada y la imagen que resultó de la binarización (Fig. 2.19), obteniéndose una zona de punteado que corresponde a la zona teñida. Para conocer el porcentaje de área teñida se realizó una relación entre el área inicial (100%) y la obtenida tras la binarización. Esta medida permite establecer comparaciones entre individuos. Por tanto, la carga amiloide fibrilar se definió como el porcentaje del área total de la región de interés teñida con Tioflavina S o Abeta42.

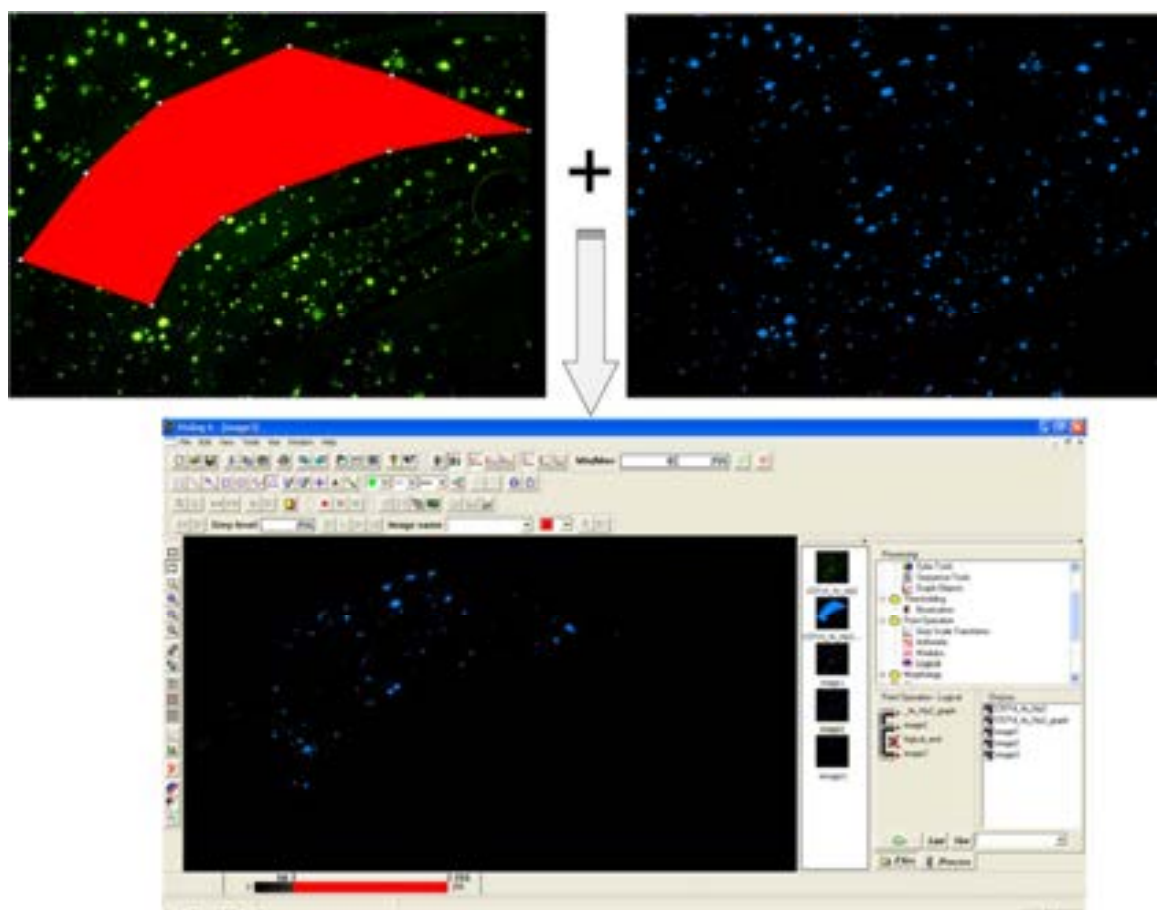


Figura 2.19. Proceso de binarización con el programa de análisis de imagen Visilog 6.3. En la imagen de la izquierda se puede observar la fotografía original sin procesar, con el área de interés seleccionada; y, a la derecha, la misma imagen tras el proceso de binarización. La tinción con Tioflavina S aparece como un punteado azul. Tras el sumatorio de ambas imágenes obtenemos la inferior, en la que tenemos el área inmunopositiva de la región de interés. El *plaque loading* corresponderá a la relación entre esta última área con respecto al área total de la región (señalada en rojo en la imagen superior izquierda).

2.8.2. Estudio del área ocupada por distrofias

Las secciones inmunomarcadas con anti-NPY o anti-ChAT se fotografiaron utilizando un microscopio Nikon Eclipse 80i con el objetivo de 10x, tal y como se describió en el apartado 2.5.1. Se fotografiaron 5 secciones por animal de cada uno de los grupos (edad y/o tratamiento, según el diseño experimental correspondiente en cada caso).

Para el análisis de imágenes se utilizó el programa Visilog 6.3 (Noesis, Francia). El área ocupada por las distrofias se identificó por un umbral que se mantuvo constante para todas las imágenes (Fig. 2.20). La región de estudio se delimitó manualmente, y los somas presentes en dicha área fueron eliminados también manualmente para evitar falsos positivos. Se representó el porcentaje del área total de la región que estaba ocupada por las distrofias.

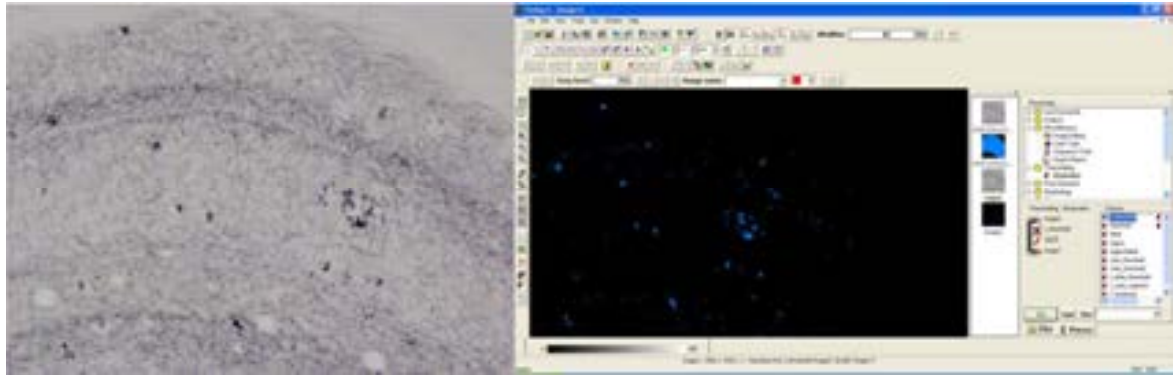


Figura 2.20. Proceso de cuantificación del porcentaje de área de una región ocupada por las distrofias mediante el empleo del programa Visilog 6.3. De la misma forma que medimos el *plaque loading* (ver Fig. 2.14), analizamos aquí el área ocupada por las distrofias axonales en nuestra región de interés. En la imagen de la derecha vemos la imagen binarizada correspondiente a las distrofias.

2.8.3. Análisis de la compactación de las placas de β -amiloide

El análisis de la compactación de las placas de β -amiloide se llevó a cabo en los animales tratados con litio y en los animales control. Las secciones hipocampales inmunoteñidas con anti-Abeta42 se fotografiaron utilizando un microscopio Nikon Eclipse 80i (ver Apdo. 2.5.1), con el objetivo de 10x. Se analizaron 5 secciones por animal y 5 animales por grupo, utilizando el programa de análisis de imagen Visilog 6.3 (Noesis, Francia).

La densidad de inmunotinción para Abeta42 se identificó mediante un umbral que se mantuvo a lo largo de todo el experimento (Fig. 2.21). La imagen, en escala de grises, se binarizó para estimar su densidad óptica que fue definida como los píxeles por unidad en relación al tamaño de la placa (en μm^2 que se midió utilizando el mismo programa).

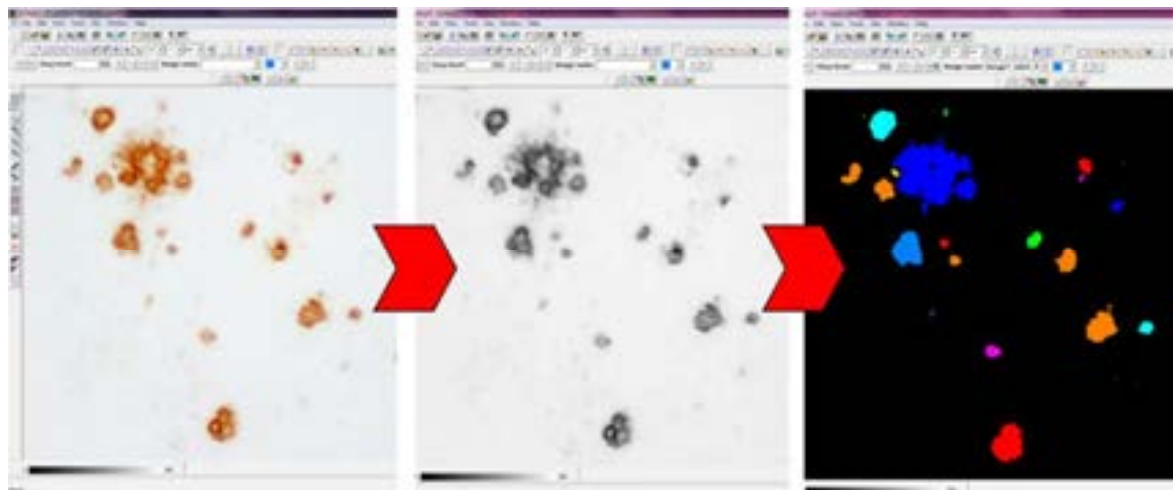


Figura 2.21. Cuantificación de la compactación de las placas. Mediante el programa Visilog, las imágenes de la inmunohistoquímica para Abeta42 reveladas con DAB (con este método de revelado se aprecian mejor las diferencias en la compactación que con DAB-níquel, que enmascara dichas diferencias) se pasaron a escalas de grises. Mediante un umbral se determinó la marca positiva que se utilizó para determinar la densidad óptica de cada una de las placas.

2.8.4. Estudio del halo oligomérico de las placas de Abeta

Para analizar el halo de Abeta oligomérico localizado en la periferia de las placas en los animales tratados con litio y sus controles, las secciones se tiñeron, primero con Tioflavina S y, luego, con un anticuerpo específico para las formas oligoméricas de Abeta (OC), que se reveló utilizando un anticuerpo secundario acoplado a un fluorocromo (Alexa 568). Las imágenes se tomaron mediante microscopía confocal (ver Apdo. 2.5.2) utilizando un microscopio Leica SP5 II. Se analizaron un total de 15 placas por animal, que se fotografiaron al azar en la región de CA1. Se estudiaron 3 animales por grupo (control y tratados con litio).

Las imágenes se analizaron utilizando el programa LAS AF Lite (Leica). Mediante este programa se determinó el área de la placa (área Tioflavina S positiva, núcleo de la placa en color verde) y el área del halo oligomérico de la misma (área OC positiva, en color rojo). La diferencia entre el área OC y el núcleo fue considerada como el halo oligomérico que rodea a las placas (Fig. 2.22).

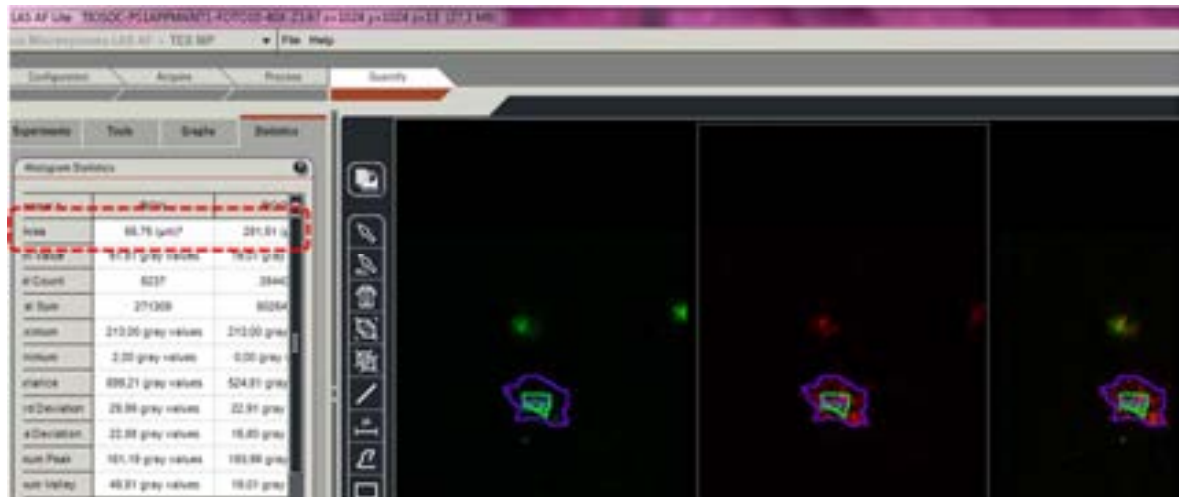


Figura 2.22. Cuantificación del halo oligomérico de las placas de Aβ. En primer lugar se delimita el núcleo de la placa (Tioflavina S positivo) para estimar su área. A continuación, se calcula el área positiva para OC (Aβ oligomérico). La diferencia entre ambas medidas (señaladas en el recuadro rojo) será considerada el halo oligomérico.

2.8.5. Estudio de la morfología microglial en los animales APP y APP/IL4^{-/-}

Para el análisis del índice de esfericidad microglial en los animales APP y APP/IL4^{-/-} se tomaron imágenes en el microscopio Nikon 80i con el objetivo 100x de las secciones inmunoteñidas con el marcador Iba1 y reveladas con DAB/Níquel. Estas imágenes se procesaron con el programa Visilog 6.3. Esta cuantificación se llevó a cabo utilizando el índice de esfericidad descrito por Heppner y col. (1998). Para ello, se delimitó la periferia de diferentes células microgliales individuales localizadas alrededor de las placas que se binarizaron para determinar el área y el perímetro celular (Fig. 2.23). La fórmula aplicada tiene en cuenta estos parámetros para el cálculo del índice de esfericidad, de manera que,

en aquellas células con una morfología circular, el valor de este índice será 1, y mientras más se aleje la morfología de la forma circular, el valor del índice será inferior.

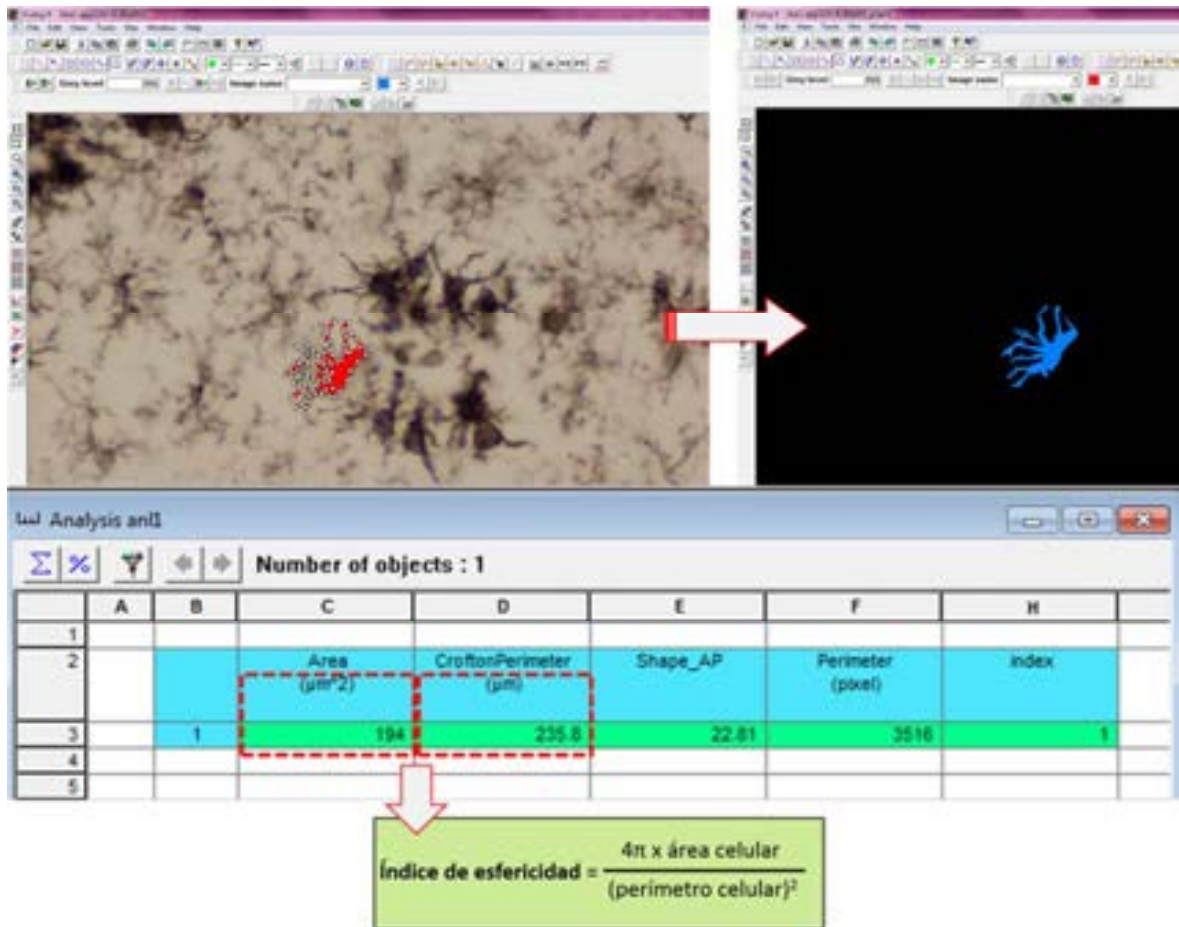


Figura 2.23. Método de cuantificación del índice de esfericidad microglial. La periferia microglial fue delimitada a mano y se binarizó la figura obtenida, calculándose el área y el perímetro que se utilizaron para el cálculo del índice de esfericidad, descrito previamente por Heppner y col. (1998).

2.9.

Estudios bioquímicos

Para complementar los resultados obtenidos con las técnicas de biología celular se han utilizado técnicas bioquímicas (PCR a tiempo real, *Western-blot* y ELISA), en colaboración con el laboratorio del Dr. Javier Vitorica (IBIS, Sevilla).

2.9.1. Disección del hipocampo y la corteza

Para los estudios moleculares realizados en corteza e hipocampo se llevó a cabo la disección de estas áreas del cerebro de ratón. Para ello, una vez anestesiados los animales y perfundidos transcárdialmente con PBS 0,1M durante 1 minuto para eliminar los restos de sangre (ver Apdo. 2.2.1), se extrajo el cerebro del que, sobre una placa de hielo, se diseccionaron dichos centros cerebrales con ayuda de unas pinzas y una hoja de bisturí. Las muestras obtenidas se conservaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior uso.

2.9.2. Aislamiento de ARN y proteínas a partir de los núcleos del cerebro

La técnica de aislamiento de ARN y proteínas se basa en la diferente solubilidad que tienen las distintas biomoléculas (ARN, ADN, proteínas y lípidos) en disolventes orgánicos como el fenol y el cloroformo.

El procedimiento consiste en pesar las muestras de hipocampo o corteza en una balanza de precisión. A continuación, se pasan a un tubo de 2 ml autoclavado. Seguidamente se añade 1 ml del reactivo *Tripure*® (tiocianato de guanidina, un agente caotrópico que desnatura las proteínas, incluyendo proteasas, ADNasas y ARNasas, y que rompen las membranas) por cada 50-100 mg de tejido que hemos pesado y se homogeniza la muestra con un *polytron* durante 20 segundos. Para que haya una disociación completa de los complejos núcleo-proteínas, se deja incubar el homogenizado

obtenido durante 5 minutos a temperatura ambiente. Con posterioridad, se añaden 0,2 ml de cloroformo por cada ml de *Tripure*® usado inicialmente. Esta mezcla se agita y se deja incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se realiza una centrifugación a 4 °C a 12000g durante 15 minutos, obteniéndose una solución con 3 fases: la fase superior acuosa, donde está presente el ARN; la interfase con el ADN; y la fase inferior, que contiene las proteínas.

2.9.2.1. Aislamiento de ARN

En el proceso de extracción del ARN es muy importante que tanto el material de trabajo como los reactivos estén libres de RNasas, por lo que se ha tratado el agua con dietilpirocarbonato (DEPC) al 0,1% (p/v) (Fedorcsak y Ehrenberg, 1966), y posteriormente para eliminar el DEPC, ya que éste por carboximetilación puede inactivar el ARN, se ha autoclavado el agua.

Con la finalidad de aislar el ARN, extraemos la fase superior, de la cual se recupera éste por precipitación con isopropanol (0,5 ml de isopropanol por ml inicial de *Tripure*®) durante 10 minutos, que lo insolubiliza. Por último, el ARN precipitado es purificado usando el sistema *ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation* (Applied Biosystems). Este sistema es capaz de purificar hasta 96 muestras simultáneamente y consiste en una bomba de vacío que aspira las muestras haciéndolas pasar por unos filtros en los que el ARN queda retenido. Finalmente, éste se disuelve con agua libre de RNasas. La purificación del ARN y su posterior recuperación usando este sistema se ha realizado siguiendo los pasos que se indican en la Tabla 2.7. El ARN purificado se cuantifica posteriormente usando un espectrofotómetro. Una vez se ha purificado y cuantificado, el ARN se almacena a -80°C hasta su posterior uso.

Tabla 2.7. Pasos para la purificación de ARN usando el sistema *ABI Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation* (Applied Biosystems). Se indican los pasos seguidos en este protocolo, así como el tiempo y volumen de reactivo utilizado.

PASO	ACCIÓN	VOLUMEN	TIEMPO	VACÍO	POSICIÓN
-	Humedecer pocillos con agua con DEPC	40 µl	-	-	-
1	Cargar muestras	0,5 ml	180 s	80%	Desechar
2	Añadir etanol absoluto 4°C	0,5 ml	180 s	80%	Desechar
3	Añadir etanol absoluto 4°C	0,4 ml	180 s	80%	Desechar
4	Añadir etanol absoluto 4°C	0,3 ml	120 s	60%	Desechar
5	Añadir etanol absoluto 4°C	0,3 ml	120 s	60%	Desechar
6	Aplicar vacío pre-elución	-	300 s	90%	Desechar
7	Suave agitación de la placa	-	-	-	Desechar
8	Eluir con agua con DEPC	150 µl	120 s	40%	Eluir
9	Suave agitación de la placa	-	-	-	Eluir

2.9.2.2. Aislamiento de proteínas totales

A partir de la interfase y la fase orgánica que hemos obtenido en el proceso de homogenización con el reactivo *Tripure*®, procedemos a extraer las proteínas totales. Estas proteínas están desnaturalizadas y se han utilizado para estudios de *Western-blot*.

Con la finalidad de obtener las proteínas totales, se ha llevado a cabo en primer lugar la precipitación del ADN para así evitar la contaminación de la muestra de proteínas. Esta precipitación se ha realizado añadiendo etanol al 100% (0,3 ml de etanol por ml de *Tripure*® usado), mezclándolo con la muestra e incubando durante 3 minutos a temperatura ambiente. Después, la muestra se centrifuga a 2000 g durante 5 minutos a 4 °C. A continuación, el sobrenadante se retiró y se pasó a un tubo nuevo donde las proteínas fueron precipitadas con isopropanol (1,5 ml de isopropanol por cada ml de *Tripure*®). Esta mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos a 4 °C. El precipitado de proteínas se lavó con 0,3M guanidina en 95% (v/v) etanol (2 ml de guanidina por cada ml de reactivo *Tripure*®) y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente, para después centrifugar a 7500 g durante 5 minutos a 4 °C. Este proceso se repitió dos veces más y luego se realizó un último lavado con 2 ml de etanol absoluto, para así eliminar los restos de guanidina. Finalmente, se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente hasta que se evaporó todo el alcohol.

Para solubilizar las proteínas, el precipitado se resuspendió en urea 8M-SDS 4% tamponado con Tris-HCl pH 7,4. Se incubó toda la noche en agitación a temperatura ambiente, tras lo cual se procedió a la determinación de la cantidad de proteína mediante el método de Lowry (Lowry y col., 1951). Las proteínas solubilizadas se almacenaron a -40 °C hasta su posterior uso.

2.9.3. Retrotranscripción

El ARN es una biomolécula muy inestable debido a la alta afinidad que tiene las ARNasas por su sustrato. Por este motivo, hemos trabajado con ADNc en nuestros análisis moleculares. Este ADNc se consigue a partir de la enzima transcriptasa inversa, que sintetiza una hebra de ADN complementaria a un molde de ARN en presencia de un cebador complementario. Después de este proceso obtenemos un híbrido ARN-ADN que, por degradación del ARN, quedará como ADN monocatenario.

En este trabajo hemos empleado el kit *High-Capacity cDNA Archive* de retrotranscripción suministrado por Applied Biosystems que viene provisto de *random primers* (pd(N)₆). La combinación de los reactivos del kit da lugar a una mezcla de reacción 2X (Retromix) detallada en la Tabla 2.8, que se mezcla con la muestra en una proporción 1:1 para llevar a cabo la retrotranscripción.

Una vez preparada la mezcla de reacción 2X, preparamos 4 µg de ARN de nuestras muestras en un volumen final de 50 µl de agua tratada con DEPC al 0,1% (p/v). Posteriormente, se desnaturaliza el ARN a 65 °C durante 10 minutos, y se enfría en hielo

para evitar la re-naturalización. Finalmente, añadimos 50 μl de la mezcla de reacción 2X (proporción 1:1 mezcla:muestra) a cada tubo de reacción, y se lleva al termociclador (MasterCycler Gradient, Eppendorf; Hamburgo, Alemania) para efectuar un ciclo de temperatura a 25 °C durante 10 minutos (para permitir el apareamiento de los cebadores con sus secuencias complementarias), seguido de 2 horas a 37 °C (para que la retrotranscriptasa sintetice el ADNc) y un calentamiento final a 85 °C durante 30 segundos (para favorecer la degradación de las hebras de ARN). El ADNc así obtenido se conserva a -40 °C hasta su uso.

Tabla 2.8. Reactivos utilizados para la preparación de la mezcla de reacción 2X (Retromix). En la tabla se indican el reactivo y las cantidades necesarias para una reacción.

Reactivos	Volumen (μl)	Concentración final
Tampón RT 10X	10	2X
Mezcla de cebadores (Random Primers RT) 10X	10	2X
Desoxinucleótidos (dNTP) mix 25X	4	2X
MultiScribe RT (50U/ μL) (transcriptasa inversa)	5	5 U/ μL
Agua + DEPC	21	
Total	50 (Volumen Final Retromix)	

Con el fin de comprobar que la cantidad de ADNc obtenida tras la reacción de retrotranscripción es la misma en todas las muestras, llevamos a cabo la amplificación de un gen *housekeeper* (GAPDH, del inglés *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) y comparamos los niveles de este gen en todas ellas. Normalmente, se obtuvo la misma expresión de este gen con poca variabilidad en todas las muestras independientemente de su origen.

2.9.4. RT-PCR en tiempo real

Se denomina RT-PCR cuando se parte de ADN obtenido a partir de ARNm mediante retrotranscripción. En la PCR a tiempo real, a diferencia de otras técnicas convencionales de PCR, el análisis de las muestras amplificadas se produce durante la misma reacción, monitorizando una señal fluorescente asociada al producto de PCR. En este trabajo hemos utilizado el termociclador *ABI 7900 HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). En la Tabla 2.9 se muestran los marcadores analizados mediante esta técnica.

Tabla 2.9. Marcadores analizados a nivel de ARNm mediante RT-PCR.

MARCADOR	CARACTERÍSTICA
β -actina	Es una isoforma de la actina. Se trata de la proteína eucariota más conservada y aparece en todos los tipos celulares. Se utiliza como control endógeno.
Acetilcolina-transferasa (ChAT)	Enzima encargada de la síntesis de acetilcolina. Permite identificar las neuronas y terminales colinérgicos.
ApoE	Apolipoproteína E. Esta lipoproteína actúa como un transportador de colesterol y,

	además, se ha propuesto que puede actuar como una chaperona que se une directamente al A β modulando su agregación y deposición <i>in vitro</i> .
CD45	Del inglés <i>cluster of differentiation 45</i> . Marcador de la microglía y macrófagos activados.
GDNF	Del inglés <i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i> . Factor neurotrófico producido por la astrogliá que participa en la supervivencia neuronal.
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida que forma los filamentos intermedios de células astrogliales. Es un marcador específico de los astrocitos.
Iba1	Molécula adaptadora (del inglés “ <i>ionized calcium binding adapter molecule 1</i> ”) que se expresa específicamente en microglía y monocitos activados. Suele asociarse con procesos inflamatorios crónicos.
IL-6	Interleuquina proinflamatoria producida por macrófagos y células T.
MMP-3 y MMP-9	Metalopeptidasas de matriz 3 y 9. Proteasas implicadas en la degradación de la matriz extracelular.
NPY	Neurotransmisor producido por una subpoblación de interneuronas GABAérgicas. Está presente en una subpoblación específica de interneuronas del hipocampo, y colocaliza mayoritariamente con somatostatina en las células O-LM y HIPP.
NT-5	Neurotrofina 5. Neurotrofina relacionada con el factor de crecimiento nervioso que participa en la supervivencia neuronal.
SOM	Neuropéptido sintetizado por una subpoblación de interneuronas GABAérgicas, como por ejemplo las células OL-M e HIPP del hipocampo y las células de Martinotti en la corteza cerebral.
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa. Es una citoquina proinflamatoria producida principalmente por macrófagos activados. Activa la vía extrínseca de la apoptosis.

Durante el transcurso de este trabajo hemos empleado dos métodos para asociar el producto de PCR específico amplificado a una señal fluorescente. Uno de ellos consiste en el uso de cebadores específicos junto con el fluoróforo de unión al ADN bicatenario *SYBR-green I*. El otro método empleado para detectar el producto específico amplificado por fluorescencia es *Taqman Gene Expression Assay® Mix 20X* (denominado comúnmente como Sondas Taqman). El procedimiento a seguir para preparar la PCR a tiempo real es ligeramente diferente en función de qué método usemos para detectar la amplificación de la diana estudiada.

En el caso de que empleemos *SYBR-green I*, junto con un par de cebadores específicos diseñados para una diana en concreto, se debe hacer en primer lugar un ensayo preliminar con diferentes cantidades de partida de ADNc. Además, se debe llevar a cabo un protocolo de disociación del producto de PCR obtenido para conocer la especificidad de nuestros cebadores durante la reacción. Una vez comprobada dicha especificidad y la eficiencia de la reacción en el ciclo *threshold* (ciclo de PCR en el que la curva de amplificación de la diana en cuestión se distingue del ruido de fondo o fluorescencia *background*), pasaremos a cuantificar la expresión de la diana deseada con respecto al *housekeeper* (GAPDH) tanto en las muestras problema como controles, empleando la ecuación de Livak y Schmittgen ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), para calcular la expresión relativa de la diana en cuestión (Livak y Schmittgen, 2001). Para preparar las reacciones de PCR empleando *SYBR-green I* seguimos los volúmenes especificados en la Tabla 2.10.

Tabla 2.10. Relación de los reactivos empleados para la amplificación por PCR a tiempo real empleando SYBR-green I. En la tabla se indica el componente de la reacción y las cantidades necesarias para una reacción.

Componentes de la reacción	Volumen (µl)
FastStart SYBR-Green® Master Mix 2X	10
Cebadores (Sentido/Antisentido)	0,6 (de cada cebador)
ADNc producto de retrotranscripción	1
Agua + DEPC	7,8
Total	20

En el caso de usar Sondas Taqman, no es necesario llevar a cabo tales comprobaciones antes de la cuantificación, pues estas sondas suministradas por Applied Biosystems han pasado previamente controles pertinentes que nos garantizan tanto su especificidad como la eficiencia de amplificación para la diana en el ciclo *threshold*. El detalle de los componentes de esta reacción se especifica en la Tabla 2.11.

Tabla 2.11. Relación de los reactivos empleados para la amplificación por PCR a tiempo real empleando sondas Taqman. En la tabla se indica el componente de la reacción y las cantidades necesarias para una reacción.

Componentes de la reacción	Volumen (µl)
Taqman® Universal PCR Master Mix 2X	10
Taqman Gene Expression Assay® Mix 20X	1
ADNc producto de retrotranscripción	1
Agua + DEPC	8
Total	20

Una vez preparadas las reacciones según la mezcla de volúmenes detallada en placas de 96 pocillos compatibles con alguno de los termocicladores empleados para PCR a tiempo real, pasamos a realizar la amplificación siguiendo el programa detallado en la Tabla 2.12. La señal fluorescente emitida por los productos de la PCR fue detectada por el lector acoplado en el termociclador y su intensidad es proporcional a la cantidad de copias generadas del amplicón durante la reacción. Para poder cuantificar las cantidades iniciales presentes de una diana determinada mediante RT-PCR en tiempo real, nos basamos en el concepto de *Cycle threshold*, ciclo *threshold* o Ct, punto en el que la fluorescencia alcanza un umbral a partir del cual el incremento en la cantidad de ADN amplificado es exponencial. El valor umbral o *threshold* se determinó automáticamente por el *software* SDS v1.7 o v3.2. En la Tabla 2.13 se muestra la secuencia de los cebadores empleados y en la Tabla 2.14 las sondas Taqman utilizadas.

Tabla 2.12. Programa predeterminado de amplificación para PCR a tiempo real. Estas condiciones han sido previamente establecidas por Applied Biosystems.

Etapas iniciales		40 ciclos	
Activación de Taq-polimerasa	Desnaturalización ADNc	Desnaturalización ADNc	Hibridación/ Elongación
2 minutos 50 °C	10 minutos 95 °C	15 segundos 95 °C	1 minuto 60 °C

Tabla 2.13. Secuencia de cebadores empleados en la PCR. En esta tabla se muestra el marcador analizado, la denominación de los cebadores murinos *up* y *low* y la secuencia específica empleada para la realización de la RT-PCR a tiempo real y el número de acceso.

PROTEÍNA	NOMBRE	SECUENCIA (5'→3')	Nº ACCESO
β-actina	B-ACTup	AAGATCATTGCTCCTCCTGAGC	NM_007393.2
	B-ACTlo	AGCTCATCGTACTCCTGCTTGC	
Colinacetil-transferasa (ChAT)	CHATup	GTAACAGCCCAGGAGAGCAGGTCGG	NM_009891
	CHATlo	TCATTCAGCCAGTATTCAGAGACCC	
GDNF	GDNFup	AGCTGCCAGCCCAGAGAATT	NM_010275.3
	GDNFlo	GCACCCCGATTTTTGC	
GFAP	GFAPup	CTCCAACCTCCAGATCCGAG	NM_010277
	GFAPlo	TCTGACACGGATTTGGTGTCC	
NPY	NPYmmUP	CATCAATCTCATCACCAGACAGA	NM_023456
	NPYmmLO	AAGGGTCTTCAAGCCTTGTTCC	
SOM	SOMmmUP	AGGATTTGCCCCAGGCAGCT	NM_009215
	SOMmmLO	TGCAGCCAGCTTTGCGTTCC	

Tabla 2.14. Sondas Taqman para RT-PCR. Se indican las sondas Taqman de Applied Biosystems, con su referencia, utilizadas para el análisis de expresión de ARNm mediante RT-PCR Real Time.

SONDA	REFERENCIA
APOE	Mm01307193_g1
CD45	Mm01293577_m1
IBA1	Mm00479862_g1
IL-6	Mm00446190_m1
MMP-3	Mm00440295_m1
MMP-9	Mm00442991_m1
NT-5	Mm01701591_m1
TNF-α	Mm00443258_m1

Para comprobar que durante el proceso de amplificación con sondas Taqman no se habían producido dímeros de cebadores, que la secuencia amplificada era la correcta y que existía una cantidad detectable, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (apéndice 2.12.11). Una vez en la cubeta de electroforesis que contiene el tampón TBE 10x, se cargaron las muestras junto con tampón de carga y un marcador de 100 pares de bases (10 ng/ml; Superladder-low 100bp ladder, Gensura Laboratories INC.) como patrón. Se cargaron 8 µl de patrón junto con 4 µl de tampón de carga, así como 5 µl de muestra y 5 µl de tampón de carga y se inició la electroforesis a un voltaje constante de 190 V. Finalmente, los geles fueron visualizados bajo la luz ultravioleta y se fotografiaron con una cámara Polaroid®.

2.9.5. Western-Blot (WB)

Esta técnica permite la cuantificación de proteínas específicas presentes en el tejido. Comienza con la electroforesis de las proteínas en geles desnaturizantes de poliacrilamida-SDS (apéndice 2.12.12) o poliacrilamida-SDS-Urea (apéndice 2.12.13), para separarlas en relación su movilidad electroforética. Dicha separación depende del tamaño de la proteína en cuestión: las proteínas de mayor peso molecular migran una menor distancia que aquellas con menor peso molecular, y se separan entre ellas más o menos dependiendo de la concentración de acrilamida del gel de corrido. La realización del gel será diferente en función del tamaño de la proteína a visualizar, de manera que para proteínas de gran peso molecular se utilizará un porcentaje bajo de poliacrilamida (el gel poseerá poros de mayor tamaño) y viceversa. Los geles de poliacrilamida-SDS usados en el presente trabajo han variado del 10-14% de acrilamida.

El gel de poliacrilamida-SDS puede realizarse en tampón glicina o en tampón tricina, en función del peso molecular de las proteínas a separar. En este trabajo se han utilizado geles de tricina al 14% y geles de glicina al 10%. Las cantidades de reactivos utilizados para preparar dichos geles se especifican en la Tabla 2.15 y en la Tabla 2.16.

Tabla 2.15. Relación de reactivos y volúmenes necesarios para obtener geles de poliacrilamida-SDS (14% de acrilamida) en tampón Tricina.

Reactivos	Gel de Corrido (<i>Running</i>)	Gel de Empaque (<i>Stacking</i>)
Acrilamida + Bisacrilamida (49,5%)	1,52 ml	202 μ l
Tris-HCl 2,5M pH 8.45	1,8 ml	620 μ l
Agua	1,72 ml	1,64 ml
SDS (10%)	47 μ l	30 μ l
TEMED	10 μ l	5 μ l
Persulfato Amónico (50%)	10 μ l	15 μ l

Tabla 2.16. Relación de reactivos y volúmenes necesarios para obtener geles de poliacrilamida-SDS (10% de acrilamida) en tampón Glicina.

Reactivos	Gel de Corrido (<i>Running</i>)	Gel de Empaque (<i>Stacking</i>)
Bis/Acrilamida (40%)	2,5 ml	0,5 ml
<i>Running</i> Buffer	2,5 ml	1,26 ml
SDS (10%)	100 μ l	25 μ l
Agua	4,86 ml	3,18 ml
TEMED	20 μ l	5 μ l
Persulfato Amónico (50%)	20 μ l	10 μ l

Antes de comenzar con la electroforesis, las muestras se prepararon ajustando la cantidad de proteína a cargar y se mezclaron con el tampón de disociación 8X, que contiene 2,3% de SDS, 10% de β -mercaptoetanol, 20% de glicerol y 0,005% de azul de bromofenol en un tampón de 10 mM Tris-HCl a pH 6,8. Posteriormente, estas muestras fueron cargadas en los geles y se corrieron a un voltaje constante de 90 V, en el caso de usar el tampón tricina, o de 160V, si el tampón era glicina.

Una vez terminada la electroforesis, se transfirieron las proteínas desde el gel hasta una membrana de nitrocelulosa o PVDF (si la electroforesis es con gel SDS-Urea). La transferencia se llevó a cabo usando el sistema en sándwich (Bio-Rad), en una cubeta de tampón de transferencia, durante 90 min. a 310 mA. Una vez terminada la transferencia, lavamos la membrana con PBS, y bloqueamos con leche al 5% en 0,1% (v/v) de Tween-20 en PBS 0,1 M (TPBS) pH 7,4 durante 30 minutos. Las proteínas transferidas a la membrana se observan mediante tinción con rojo Ponceau's al 0,1% en ácido acético 5%.

A continuación, incubamos la membrana con el anticuerpo primario (en TPBS-leche al 1,5%) durante toda la noche a 4 °C. La relación de los anticuerpos empleados y sus características más relevantes se detallan en la Tabla 2.17. Terminada la incubación, lavamos la membrana con TPBS (3 x 5 minutos) e incubamos en el anticuerpo secundario acoplado a la enzima peroxidasa de rábano, capaz de procesar un sustrato (ECL-plus) originando un producto quimioluminiscente cuya señal será proporcional a la cantidad de proteína específica de la muestra. La señal quimioluminiscente obtenida se revela en cuarto oscuro utilizando películas fotográficas (Hyperfil-ECL, Amersham; revelador y fijador Kodak). Todos los anticuerpos secundarios se incuban como mínimo durante 1 hora a temperatura ambiente en TPBS. La señal quimioluminiscente es recogida con el sistema de captación IQ LAS 4000 mini gold. Finalmente, la intensidad de las bandas de las películas se determinará utilizando el *software* PCBAS v2.0 sobre las imágenes escaneadas (Epson 3200).

Tabla 2.17. Marcadores detectados mediante *Western-blot*. Se indica la dilución de uso, el tamaño de la banda reconocida, el animal de obtención y la referencia junto a la casa comercial.

ANTICUERPO PRIMARIO	DILUCIÓN DE USO	BANDA RECONOCIDA	ANIMAL DE OBTENCIÓN	REFERENCIA
Anti-Aβ (6E10)	1:5000	4,5 kDa (1 mer)	Ratón	Signet; Ref.: 6E10
Anti-AT8	1:1000	66 kDa	Ratón	Thermo-Scientific; ab34719
Anti-ChAT	1:1000	68 kDa	Cabra	Millipore; Ref.: AB144P
Anti-Hsp27	1:1000	27 kDa	Conejo	Sigma; SAB4501456
Anti-Hsp60	1:1000	80 kDa	Ratón	Santa Cruz Biotech.; Ref.: sc-1052
Anti-Hsp70	1:5000	70 kDa	Conejo	Neomarkers; MA3-028
Anti-LC3	1:1000	16 kDa (LC3-I) 12 kDa (LC3-II)	Conejo	Cell signaling; 2775
Anti-Ubiquitina	1:1000	66 kDa	Ratón	Thermo Scientific; Ubi-1

2.9.6. ELISA (Del inglés *Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay*)

Esta técnica permite determinar cuantitativamente la cantidad de proteína presente en una muestra mediante una reacción colorimétrica. Para llevarla a cabo son necesarios dos anticuerpos que reconozcan dos epítomos de una misma proteína. El primer anticuerpo se encuentra fijado a la base del pocillo y actúa como anticuerpo de captura, mientras que el segundo actúa como anticuerpo de detección y será el encargado de desencadenar la

respuesta colorimétrica. Dicha señal colorimétrica se produce utilizando, bien un anticuerpo de detección conjugado con HRP (peroxidasa de rábano) (Kit ELISA A β x-42), o bien un anticuerpo secundario conjugado con HRP (Kit ELISA A β 40) que deberá reconocer al anticuerpo de detección.

El primer paso es preparar la curva patrón con el estándar y el tampón de dilución suministrado por el kit. Seguidamente, preparamos nuestras muestras siguiendo las indicaciones de cada kit. Se añaden cada una de las muestras y las diferentes diluciones de la curva patrón a los pocillos de la placa de ELISA que ya contienen el anticuerpo de captura unido. Se incuba toda la noche con el anticuerpo de detección a 4 °C. Posteriormente, se hacen 4 lavados con el tampón de lavado del kit y se reincuba con el anticuerpo secundario durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se repiten los 4 lavados y se incuba con la solución de cromógeno estabilizado durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. En este tiempo se generará color según la cantidad de proteína presente en la muestra. Pasados 30 minutos añadimos una solución para parar la reacción enzimática y medimos la absorbancia de cada punto.

2.10.

Estudios de comportamiento

Los experimentos de comportamiento se llevaron a cabo en las instalaciones del Estabulario de la Universidad de Málaga, siempre en el periodo de luz del ciclo de luz/oscuridad y el experimentador fue siempre ciego al genotipo de los animales. Los animales se adaptaron durante 6 días a las condiciones experimentales antes de empezar las pruebas de comportamiento. Para minimizar el estrés, todos los animales se movieron a la habitación donde éstas se realizaban en su caja y se mantuvieron en la habitación de

experimentación durante 1 hora para que se habituaran la nueva localización, posteriormente, fueron manipulados por el experimentador.

2.10.1. Estudios de comportamiento para el tratamiento de litio

Todos los experimentos se llevaron a cabo con ratones macho de la misma edad. Se utilizaron ratones WT (n=10), PS1 (n=10), PS1/APP control (n=9) y PS1/APP tratados con litio (n=9).

2.10.1.1. Prueba “Open Field”

Esta prueba no sólo permite la habituación de los animales al lugar donde luego realizarán la prueba de reconocimiento de objetos, sino también nos posibilita examinar la función motora al medir la actividad locomotora espontánea.

En esta prueba, los animales se sitúan en el centro de un recipiente cuadrado (45 x 45 cm) y se les deja explorar durante 5 minutos (Fig. 2.24). Entre prueba y prueba, el recipiente se limpia con etanol de 70°. La actividad locomotora es monitorizada (Ethovision, Noldus, The Netherlands) y se cuantifica la distancia recorrida y la velocidad.

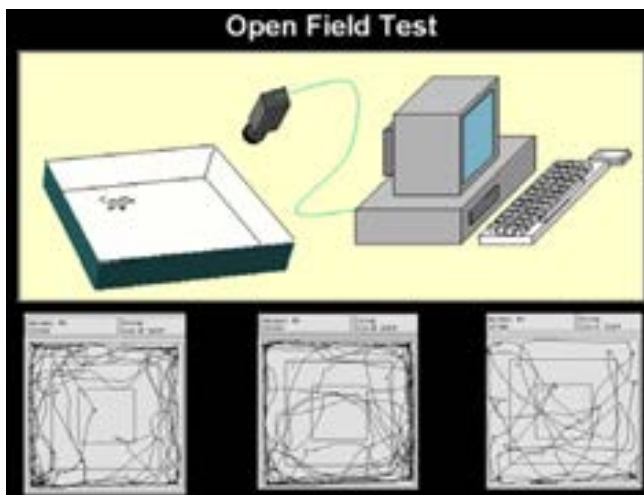


Figura 2.24. “Open Field Test”. El ratón se sitúa en el centro del recipiente y se deja explorar libremente durante 5 minutos.

2.10.1.2. Prueba de reconocimiento de objetos

Esta prueba se basa en la tendencia natural de los roedores a explorar objetos. Aquí, hemos utilizado un protocolo modificado (Davis y col., 2013), basado en la preferencia por el “objeto familiar viejo” sobre el “objeto familiar reciente” y la preferencia por una nueva localización.

Después de 60 minutos habituándose al *open field*, los animales se expusieron a 4 objetos idénticos con una forma triangular y los exploraron durante 10 minutos (muestra 1). Tras 2 horas, los ratones recibieron una segunda muestra con otros cuatro objetos idénticos entre sí, pero diferentes a los primeros (muestra 2). Esta segunda muestra fue explorada durante 10 minutos. Tras 2 horas de intervalo, los ratones fueron sometidos a la prueba (test), que tuvo una duración de 5 minutos. En la prueba, dos objetos de ambas

muestras 1 y 2 (“familiar viejo” y “familiar reciente”, respectivamente) se colocaron en una configuración en forma de cuadrado, de manera que un objeto viejo y uno reciente estaban presentes en una posición familiar mientras que los otros dos estaban desplazados a una nueva posición (Fig. 2.25).

Todos los objetos fueron validados, y se utilizaron de plástico para evitar preferencias por parte del animal debido al material de fabricación, y para facilitar la limpieza evitando señales por olor. Las dos muestras de objetos fueron diferentes en tamaño, forma y color. Tanto el recipiente donde se llevó a cabo la prueba, como los objetos, se limpiaron con etanol de 70° entre prueba y prueba.

El tiempo que pasó cada animal explorando cada objeto fue analizado observacionalmente. De hecho, la medida básica fue el tiempo que pasó el ratón explorando el objeto durante las fases de muestra y durante la prueba (test). Se calcularon dos índices de discriminación para la prueba: la ratio de reconocimiento de objeto (tiempo total explorando objetos “familiares viejos”/tiempo total de exploración) y la ratio de reconocimiento de localización (tiempo total explorando objetos desplazados/tiempo total de exploración). El tiempo fue registrado sólo cuando el ratón tocaba el objeto con la nariz o con la uña. Dar vueltas alrededor, aproximarse al objeto o estar cerca del mismo no se consideró exploración. Además, la actividad locomotora se midió también con el *software* Ethovision XT 7.0 (Noldus, The Netherlands).

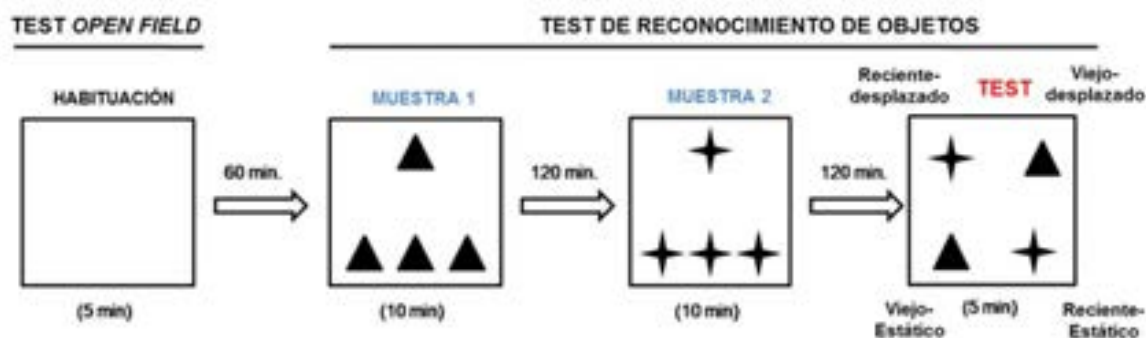


Figura 2.25. Protocolo de la prueba de reconocimiento de objetos. Se muestran los tiempos utilizados en cada una de las muestras y la disposición de los objetos en éstas.

2.10.2. Estudios de comportamiento en animales PS1/APP y PS1 a los 12 meses de edad

Para evaluar el daño cognitivo de los animales tg PS1/APP y PS1 a los 12 meses de edad, se realizó una prueba de reconocimiento de objetos a estos animales junto con animales WT de la misma edad. El procedimiento que se siguió fue el mismo que el descrito para los animales tratados con litio (ver Apdo. 2.10.1.2), pero con la diferencia de que en este caso el test duró 10 minutos en lugar de 5 (Fig. 2.25). El análisis de los resultados se llevó de la misma forma descrita en el apartado anterior.

2.11.

Análisis estadístico de datos

En general, durante este estudio los valores han sido representados como la media del grupo \pm la desviación estándar (SD). En los estudios bioquímicos, la mayoría de los datos se han expresado con respecto al grupo control (WT, valor de referencia 1).

El análisis estadístico de los datos se realizó introduciendo los datos en el programa estadístico Sigma Stat 3.5 (Advisory Statistics for Scientists), mediante el análisis de la varianza (ADEVA) de una o dos vías para estudiar las posibles diferencias entre la edad y/o el genotipo estudiado, seguida de los grados de libertad. Para las pruebas *post-hoc* se empleó la prueba de Tukey, Bonferroni o Newman-Keuls. Cuando la distribución de los datos seguía una distribución normal se realizó una prueba Kruskal-Wallis. En los casos en los que fue imposible utilizar pruebas de comparaciones múltiples, se aplicó la prueba T de Student de dos colas (prueba bilateral con intervalo de confianza del 95-99%).

El nivel de significación en las pruebas es de $p < 0,05$, señalado con una estrella (*), $p < 0,01$ señalado con dos estrellas (**), o $p < 0,001$ señalado con tres (***)

2.12.

Apéndice

2.12.1. Genotipado

<u>PS1</u>	<u>SECUENCIA</u>	<u>PRODUCTO DETECTADO</u>	<u>TAMAÑO</u>
PS. F	5' GCACAGAAAGGGAGTCACAAG 3'	Transgén	450 pb
PS. R	5' TAATTGGTCCATAAAAAGGC 3'		
Myo.F	5' TTACGTCCATCGTGGACAGC 3'	WT	250 pb
Myo.R	5' TGGGCTGGGTGTTTAGCCTTA 3'		

REACTIVO (Concentración inicial)	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
PS.F (10 µM)	2,5 µl	0,5 µM
PS.R (10 µM)	2,5 µl	0,5 µM
MyO.F (10 µM)	2,5 µl	0,5 µM
MyO.R (10 µM)	2,5 µl	0,5 µM
dNTPs (10 µM)	1 µl	0,2 µM
MgCl ₂ (25 µM)	3 µl	1,5 mM
Buffer 5x	10 µl	
Go Taq Flexi DNA polymerase (5U/ µl)	0,25 µl	
H ₂ O MilliQ	24,75 µl	
gADN	1 µl	
Volumen final	50µl	

CICLOS PCR:

1. 95 °C 15 min.
2. 94 °C 45 s.
3. 55 °C 45 s.
4. 72 °C 45 s.

5. Repetir 2-4 34 veces (35 ciclos en total)
6. 72 °C 10 min.
7. 4°C mantener

<u>APP</u>	<u>SECUENCIA</u>	<u>PRODUCTO DETECTADO</u>	<u>TAMAÑO</u>
AppKoz.F	5' GGCTGAGGAACCCTACGAAGA 3'	Transgén	157 pb
AppKoz.R	5' CAAAGTACCAGCGGGAGATCA 3'		
CQI.F	5' GATCATGACCGCCGTAGG 3'	WT	300 pb
CQI.R	5' CATGAACTTGCCAGGCTT 3'		

REACTIVO (Concentración inicial)	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
AppKoz.F (10 µM)	2,5 µl	0,5 µM
AppKoz.R (10 µM)	2,5 µl	0,5 µM
CQI.F (10 µM)	2,5 µl	0,5 µM
CQI.R (10 µM)	2,5 µl	0,5 µM
dNTPs (10 µM)	1 µl	0,2 µM
MgCl ₂ (25 µM)	3 µl	1,5 mM
Buffer 5x	10 µl	
Go Taq Flexi DNA polymerase (5U/ µl)	0,25 µl	
H ₂ O MilliQ	24,75 µl	
gDNA	1 µl	
Volumen final	50µl	

CICLOS PCR:

1. 95 °C 15 min.
2. 94 °C 45 s.
3. 55 °C 45 s.
4. 72 °C 45 s.
5. Repetir 2-4 29 veces (30 ciclos en total)
6. 72 °C 10 min.
7. 4 °C mantener

<u>IL-4</u>	<u>SECUENCIA</u>	<u>PRODUCTO DETECTADO</u>
oIMR0077	5' GCACAGAGCTATTGATGGGTC 3'	WT
oIMR0078	5' GCTGTGAGGACGTTTGGC 3'	Common
oIMR0078	5' TCAGGACATAGCGTTGGC 3'	Mutant

REACTIVO (Concentración inicial)	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
Cebador A (10 µM)	2 µl	0,4 µM
Cebador B (10 µM)	2 µl	0,4 µM
My Taq Reaction Buffer 5x (5mM dNTPs, 15 mM MgCl ₂)	10 µl	dNTPs 1mM MgCl ₂ 3mM
My Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0,25 µl	1,25 U
H ₂ O MilliQ	33,75 µl	
gDNA	2 µl	
Volumen final	50µl	

CICLOS PCR:

1. 95 °C 3 min.
2. 94 °C 30 s.
3. 61°C 1 min.
4. 72 °C 1 min.
5. Repetir 2-4 35 veces (36 ciclos en total)
6. 72 °C 2 min.
7. 4 °C mantener

2.12.2. Tampones para inmunohistoquímica

- Tampón fosfato (PB) 0,4 M pH 7,4

Dihidrógenofosfato sódico $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	13,6 g
Hidrógenofosfato disódico $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	53,4 g
H_2O desionizada	hasta 1000 ml
Disolver y ajustar pH 7,4	

- Tampón fosfato salino (PBS) 0,1 M pH 7,4

Cloruro sódico NaCl	9 g
PB 0,4M pH 7,4	250 ml
H_2O desionizada	hasta 1000 ml

- Tampón citrato sódico 50mM pH 6

Citrato sódico $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,47 g
Una vez ajustado el pH a 6 con NaOH, enrasar con H_2O desionizada hasta un volumen final de 100 ml.	

2.12.3. Solución fijadora

- Paraformaldehído 4%, L-lisina 75 mM, Metaperyodato sódico 10 mM (PLP; McLean y Nakane, 1974) en PB 0,1 M pH 7,4

Paraformaldehído $(\text{CH}_2\text{O})_n$	4 g
L-lisina monoclóridato $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_2$	1,37 g
Metaperyodato sódico $\text{I}(\text{NaO}_4)$	0,21 g
PB 0,2M, pH 7,4	50 ml
H_2O desionizada	50 ml

 1. Disolver 4 g de paraformaldehído en 25 ml de agua destilada previamente calentada a 60 °C. Añadir unas gotas de NaOH para su completa disolución.
 2. Filtrar y completar con agua destilada hasta 50 ml, y dejar enfriar.
 3. Añadir 1,37 g de L-lisina y 0,21 g de metaperyodato sódico disueltos en 50 ml de PB 0,2M, pH 7,4.

Se utilizarán 200 ml de fijador para cada ratón en la fijación por perfusión.

2.12.4. Solución crioprotectora

- Sacarosa al 30% con azida sódica al 0,02%

Sacarosa $C_{12}H_{22}O_{11}$	30 g
Azida sódica	20 μ l
PBS 0,1M pH 7,4	hasta 100 ml

2.12.5. Portaobjetos gelatinizados

- Solución de Gelatina

Gelatina oro	1 g
Alumbre de cromo $KCr(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	0,1 g
H_2O desionizada	200 ml

 1. Disolver la gelatina en agua desionizada calentada a 60 °C.
 2. Añadir el alumbre de cromo y diluir.
 3. Filtrar la solución.
- Gelatinizado de los portaobjetos
 1. Desengrasa los portaobjetos en una mezcla de alcohol absoluto:éter (1:1) durante al menos un día.
 2. Secar los portaobjetos.
 3. Sumergirlos en la solución de gelatina, preparada minutos antes, se darán dos pases de 10 segundos cada uno.
 4. Dejar secar en la estufa de 37 °C durante 24 horas. Los portaobjetos son viables durante al menos dos meses desde su preparación.

2.12.6. Solución de revelado

- Preparación 3-3'-diaminobencidina (DAB) tetrahidro-clorhídrico al 0,05%:
 - Tampón Tris-clorhídrico 0,1 M a pH 7,4:

Tris 50 mM	0,06 g
Agua destilada	50 ml
Ajustar pH con ácido clorhídrico	
 - Disolver DAB 0,3 g

Una vez preparado, se filtró y almacenó en alícuotas de 500 μ l que se mantuvieron a – 20°C.
- Preparación solución revelado DAB 0,05%-níquel 0,03%:

Níquel Sulfato amónico	0,012 g
PBS 0,1 M pH 7,4	15 ml
DAB-Tris	500 μ l (1 alícuota)
- Diluir previamente el níquel en el tampón, a continuación añadir el DAB-Tris previamente descongelado. Filtrar la solución antes de usar. Para iniciar la reacción añadir peróxido de

hidrógeno al 0,01% en PBS 0,1 M. En el caso de hacer el revelado sólo con DAB, obviar exclusivamente la adición del Níquel.

2.12.7. Protocolo para deshidratación y montaje

H ₂ O desionizada	10 min
Etanol 50°	10 min
Etanol 70°	10 min
Etanol 96°	10 min
Etanol 100°	10 min
Disolvente natural (xileno)	15 min
Montaje con DPX	

2.12.8. Medio de montaje para inmunohistoquímica fluorescente

- 1,4-diazabicyclo[2.2.2.]octano (DABCO)
 1. Preparar una mezcla PBS 0,1M pH 7,4 y glicerol en una proporción 1:1.
 2. Diluir 3% de DABCO en la mezcla preparada.
 3. Mantener el DABCO a 4 °C y en oscuridad.

2.12.9. Preparación de microscopía electrónica de transmisión (MET)

- Agarosa al 3% en H₂O desionizada

Agarosa	3 g
H ₂ O desionizada	100 ml

La agarosa se añade al agua desionizada previamente calentada y se pone en agitación constante para permitir su correcta solubilización. Una vez disuelta la agarosa y sin que queden burbujas en ella, se vierte cuidadosamente en el molde y se deja enfriar unos segundos antes de introducir en ella el tejido fijado a encastrar.
- Tetraóxido de osmio 1% en PBA 0,1M pH 7,4

Tetraóxido de osmio 4%	
PBS 0,1 M	

Se mezclan ambos compuestos en proporción 1:3. El volumen preparado dependerá de la necesidad en cada momento.
- Resina para inclusión

Araldita	10,8 g
DDSA	9,2 g
DMP-30	0,4 g

 1. Preparar inmediatamente antes de usar.
 2. Añadir en primer lugar la araldita y, a continuación, el DDSA. Se mezcla bien ambos componentes con una varilla de vidrio hasta que estén completamente mezclados y sin burbujas.

3. Añadir el acelerador DMP-30 y agitar de nuevo hasta la mezcla total.

▪ Contrastado del tejido

Acetona 70%

Acetato de uranilo

Se debe preparar inmediatamente antes de su uso, en material plástico desechable y en el servicio de radioisótopos de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Málaga. Ambos compuestos se mezclan bien mediante agitación. La cantidad a preparar dependerá de la necesidad.

▪ Solución de crioprotección

H ₂ O desionizada	77,5 ml
Azida sódica (al 10%)	200 µl
Glicerol	10 ml
PB (0,4 M)	12,5 ml
Sacarosa	25 g

▪ Solución de bloqueo 1 (diluyente de los anticuerpos)

Azida sódica (al 10%)	1 ml
BSA (Albúmina de suero bovino)	2 g
Tritón X-100	2 µl
PBS 0,1 M	100 ml

▪ Solución de bloqueo 2

BSA 0,8%
Gelatina de pescado 0,1%
PBS 0,1 M

2.12.10. Tinciones

▪ Violeta de cresilo 1%

Violeta de cresilo	1 g
Ácido acético glacial	1 ml
H ₂ O desionizada	99 ml

▪ Rojo congo al 20%

Rojo congo (C ₃₂ H ₂₂ N ₆ Na ₂ O ₆ S ₂)	2 ml
NaCl 0,03% p/v	0,3 g
Etanol 100°	8 ml
Filtrar antes de usar	

▪ Tioflavina S 0,02%

Tioflavina S	0,02 g
Etanol 50°	100 ml

- Azul de toluidina

Azul de toluidina	0,5 g
Tetraborato sódico decahidratado ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)	0,5 g
H_2O desionizada	100 ml

Se prepara por un lado el azul de toluidina al 1% en 50 ml de agua desionizada y se disuelve bien. A continuación, añadimos tetraborato sódico al 1% en 50 ml de agua desionizada y se deja disolver completamente. Se mezclan a partes iguales ambas disoluciones y se filtra.

2.12.11. Gel de agarosa para electroforesis

- Tampón TBE 10x

Tris	108 g
Ácido bórico	54g
EDTA	40 ml

Una vez ajustado el pH a 8, enrasar con H_2O desionizada hasta un volumen final de 100 ml.

- Gel agarosa 1,5%

Tampón TBE 10x	230 ml
Agarosa	4,8 g
Bromuro de etidio	12 μl

1. Mezclar el tampón TBE 10x con la agarosa, calentando a 60 °C para su completa disolución.
2. Añadir el BrEt y dejar enfriar en el molde (15-20 min) con los peines para formar las calles.

- Tampón de carga

Azul de bromofenol	25 mg
Tris 500 mM pH 7,4	1 ml
Glicerol al 87%	10 ml
H_2O	hasta 50 ml

2.12.12. Gel de acrilamida 16%-SDS para electroforesis / gel de empaque 3%

Acrilamida 30%	2,67 ml / 0,5 ml
Bisacrilamida 1%	1,05 ml / 0,5 ml
Tampón gel de corrido/empaque	1,25 ml / 2,5 ml
Agua	0,03 ml / 1,5ml
PSA 50%	10 μl / 5 μl
TEMED	10 μl / 10 μl

1. Para preparar el gel de poliacrilamida (*running-gel*) se combinan los reactivos y se vierte la mezcla entre los cristales del molde (Bio-Rad) compatibles con el sistema de electroforesis Mini-Protean 3.

2. Una vez polimerizado el gel, preparar el gel de empaque (*staging-gel*), verter sobre el gel de corrido e introducir los peines molde.
3. Cuando el gel de empaque ha polimerizado, retirar los peines y acoplar los geles al sistema de electroforesis. Añadir a la cubeta el tampón para electroforesis, asegurando el contacto de los geles con dicho tampón.
 - ✓ Tampón gel corrido (4x): SDS al 0,4% en 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
 - ✓ Tampón gel empaque (2x): SDS al 0,2% en 0,25 M Tris-HCl pH 6,8

2.12.13. Gel de acrilamida-SDS-Urea 8 M para electroforesis / gel de empaque 3% / gel de carga (Separación isoformas de A β)

Urea	4,8 g / 0 / 0
Acrilamida/Bisacrilamida	1,67 ml / 0,4 ml / 0,4 ml
Tampón gel de corrido/empaque/carga	2,5 ml / 2 ml / 2 ml
SDS 10%	0,25 ml / 0,1 ml / 0,1 ml
Agua	1,84 ml / 1,5 ml / 1,5 ml
PSA 10 %	24 μ l / 40 μ l / 21 μ l
TEMED	5 μ l / 7 μ l / 8 μ l

1. Preparar el gel de corrido (10 ml, 2 geles grosor 0,75 mm): 8 M Urea-9,5% acrilamida y 0,5% bisacrilamida (10% T 5%C), 0,25% SDS en tampón Tris-H₂SO₄ pH 8,1. Para la construcción de este gel combinamos los reactivos en las proporciones detalladas, sin añadir persulfato amónico (PSA) ni TEMED, para evitar la polimerización. Agitamos la mezcla durante 30 minutos hasta que la urea quede disuelta, añadimos los catalizadores, vertemos 5 ml entre los cristales y esperamos la polimerización durante 30 minutos.
2. Una vez finalizada la polimerización del gel de corrido, preparamos el gel de empaque (4 ml, 8-10 geles de grosor 0,75 mm): 5,8% acrilamida y 0,2% bis-acrilamida (6% T 3% C), 0,25% SDS en un medio Bis-tris- H₂SO₄ pH 6,7 siguiendo las combinaciones descritas. Vertemos 350 μ l de la mezcla entre los cristales y esperamos 30 minutos hasta que polimerice. A diferencia de los geles de poli-acrilamida-SDS, en este caso, además de un gel de empaque, también debemos preparar un gel de carga, donde se introduce el peine molde adecuado para conseguir las hendiduras donde cargar las muestras.
3. La composición del gel de carga (4 ml, 8-10 geles de grosor 0,75 mm): 5,8% acrilamida y 0,2% bis-acrilamida (6% T 3% C), 0,25% SDS en un medio Bis-Tris-Bicina pH 7,7. Una vez preparado el gel, pasamos a mezclar la cantidad de muestra necesaria con tampón de carga en una proporción 1:1. Para los geles de urea siempre se ha utilizado voltaje constante (100 V) durante 1 hora y 40 minutos.
 - ✓ Tampón gel corrido (4x): 0,4 M ácido sulfúrico y 1,6 M Tris, pH 8,1.
 - ✓ Tampón gel empaque (2x): Solución 0,8 M Bis-Tris y 0,2% ácido sulfúrico, pH 6,7.
 - ✓ Tampón gel de carga “*well-buffer*” (2x): Solución 0,72 M Bis-Tris y 0,32 Bicina, pH 7,7.

- ✓ Tampón de electroforesis para el ánodo: 200 mM Tris y 50 mM ácido sulfúrico, pH 8,1.
- ✓ Tampón de electroforesis para el cátodo: 200 mM Bicina, SDS y 100 mM NaOH, pH8,2.
- ✓ Tampón de carga para muestras (2x): 0,72 M Bis-Tris, 0,32 Bicina, 30% sacarosa, 2% SDS y 0,015% azul de bromofenol.

2.12.14. Listado de reactivos

Acetato de uranilo (Idistec, Ref. #22400)
 Acetona (Panreac, Ref. 141007.1211)
 Ácido acético glacial (Panreac, Ref. 141008.1611)
 Ácido bórico (Sigma, Ref. B7901)
 Ácido fórmico 85% (Panreac, Ref. 141029.1611)
 Acrilamida (Serva, Ref. 10675)
 Agarosa (electroforesis) (Ecogen, Ref. AG-120)
 Agarosa (Gellyphor, Ref. EMR010100)
 Alumbre de cromo (Panreac, Ref. 141284)
 Araldita 502 kit (Electron Microscopic Sciences, Ref. 13900)
 Azida Sódica (Panrec, Ref. 122712.1608)
 Azul de bromofenol (Sigma, Ref. B0126)
 Azul de toluidina (Farmitalia Carlo Erba, Ref. 429282)
 Bicina (Sigma, Ref. B3876)
 Bisacrilamida (Sigma, Ref. M7256)
 Bromuro de Etidio (Amresco, Ref. E406)
 Citrato Sódico (Panreac, Ref. 131655)
 Cloroformo (Sigma)
 Cloruro Sódico (Panreac, Ref. 131659)
 (DAB) 3-3'-diaminobencidina tetrahidro-clorhídrico (Sigma-Aldrich, Ref. D5637)
 DABCO (Sigma-Aldrich, Ref. D-2522)
 DDSA (Dodecenyl succinic anhydride) (Idistec, Ref. #13700)
 DEPC (dietilpirocarbonato) (Sigma, Ref. D5758)
 Dihidrógenofosfato sódico (Merck, Ref. 1.06346)
 DMP-30 (Tri D-Metilaminoetil fenol) (Electron Microscopy Science, Ref. 13600)
 DPX medio de montaje (BDH, Ref. 360294H)
 EDTA (Ácido EtilenDiaminoTetraAcético) (Sigma, Ref. E9884).
 Etanol absoluto parcialmente desnaturalizado (Panreac, Ref. 212801.1214)
 Etanol absoluto deshidratado (Merck, Ref. 1.00983.1000)
 Éter dietílico (Panreac, Ref. 212770.0311)
 ExtrAvidin® conjugada a peroxidasa (Sigma-Aldrich, E-2886)
 FastStart SYBR-Green Master Mix 2x (Roche)
 Gelatina oro (Panreac, Ref. 251336)
 Glicerol (Panreac, Ref. 141339)

Glicina (Applichem, Ref. A1377)
 Glutaraldehído 25% (Electron Microscopy Science, Ref. 16210)
 Guanidina (Sigma, Ref. G9277)
 Hidrógenofosfato disódico (NaHPO₄ • 2H₂O, Merck, Ref. 1.06580)
 H₂O sin nucleasas (AccuGene, Ref. 51200)
 Inhibidores de fosfatasa: VO₄ Na₃ 1mM y FNa 50 mM (Sigma)
 Inhibidores de proteasas (Roche, Ref. 11697498001)
 Isopropanol (Sigma)
 Kit de Bloqueo Avidina-Biotina (Vector Labs, Ref. SP-2001)
 Kit de ELISA para Aβ₄₀ humano (Invitrogen, Ref. KHB3481)
 Kit de ELISA para Aβ₄₂ humano (DGR)
 Kit de retrotranscripción *High-Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems, Ref. P/N 4322171)
 Kit HQ SILVER™ (Nanoprobes, Ref. 2012)
 Kit Pico Pure™ RNA Isolation (Arcturus, Ref. Kit0214)
 L-Lisina monoclóhidrato (Merck, Ref. 1.05700)
 Leche desnatada (Bio-Rad, Ref. #170-6404)
 Membranas nitrocelulosa diámetro de poro 0,45 μm (Amersham, Hybond-C extra)
 Membranas de PVDF, diámetro de poro 0,45 μm (Millipore, Immobilon-P)
 Metaperyodato sódico (Merck, Ref. 1.06597)
 Metanol (Panreac, Ref. 141091.1211)
 Níquel Sulfato amónico (Farmitalia Carlo Erba, Ref. 464545)
 Paraformaldehído (Merck, Ref. 1.04005)
 Pentobarbital sódico 20% (Dolethal®, Vetoquinol S.A.)
 Peróxido de Hidrógeno 30% (Panreac, Ref. 107210.0250)
 Persulfato amónico (PSA) (Sigma, Ref. A3678)
 Rojo congo (Sigma-Aldrich, Ref. C6277)
 Sacarosa (Panreac, Ref. 131621)
 SDS (Applichem, Ref. A2263)
 Solución Bluing (Sigma-Aldrich, Ref. S5134)
 Solución Ficoll PM400 (GE Healthcare, Ref.17-0300-10)
 Solución Rojo Ponceau'S (Sigma, Ref. P3504)
 SYBR Green I (Roche Diagnostics, Ref. 04673522001)
 Taqman Gene Expression Assay Mix 20x (Applied Biosystems)
 Tetraborato sódico decahidratado (Panreac, Ref. 1.06303.1000)
 Tetrametiletilendiamina (TEMED) (Sigma; T9281)
 Tetróxido de Osmio, solución al 4% (Electron Microscopic Sciences, Ref. 19150)
 Tioflavina S (Sigma-Aldrich, Ref. T1892)
 Tripure® (Roche)
 Tris clorhídrico 50 mM (Sigma-Aldrich, Ref. T1503 Trizma®)
 Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, Ref. T9284)
 Tween-20 (Sigma, Ref. P1379)

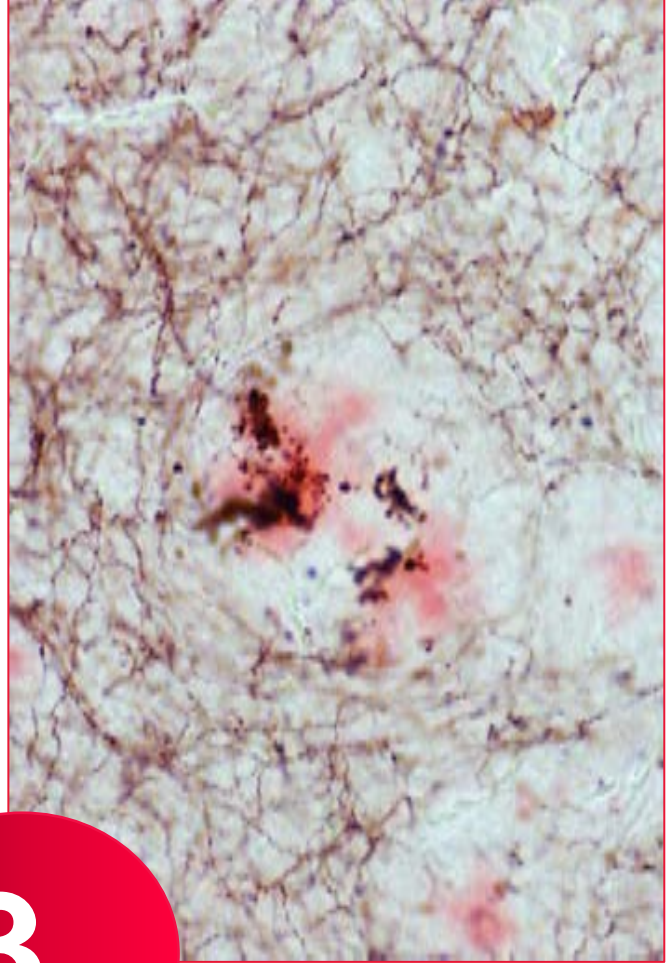
Urea (Panreac, Ref. 121754.1211)
 Violeta de cresilo (Certistain®, Merck, Ref. 115940)
 Xileno (Panreac, Ref. 141769.2711)

BIBLIOGRAFÍA

- Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J.** (2008). The hippocampus book. Oxford University Press.
- Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, Planche M, Canton T, Jedidi I, Gohin M, Wirths O, Bayer TA, Langui D, Duyckaerts C, Tremp G, Pradier L.** (2003). Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with A β deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp Neurol.* 184(1):247-263.
- Bussiere T, Bard F, Barbour R, Grajeda H, Guido T, Khan K, Schenk D, Games D, Seubert P, Buttini M.** (2004). Morphological characterization of Thioflavin-S-positive amyloid plaques in transgenic Alzheimer mice and effect of passive A β immunotherapy on their clearance. *Am J Pathol.* 165(3):987-995.
- Cooke SF, Bear MF.** (2015). Visual recognition memory: a view from V1. *Curr Opin Neurobiol.*, 35:57-65.
- Cooper CE, Lowenstein DH.** (2002). Hippocampus. Encyclopedia of life sciences.
- Danglot L, Triller A, Marty S.** (2006). The development of hippocampal interneurons in rodents. *Hippocampus*, 16(12):1032-1060.
- Davis KE, Easton A, Eacott MJ, Gigg J.** (2013). Episodic-like memory for What-Where-Which occasion is selectively impaired in the 3xTgAD mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimer Dis.* 33:681-698.
- Détári L, Rasmusson DD, Semba K.** (1999). The role of basal forebrain neurons in tonic and phasic activation of the cerebral cortex. *Prog Neurobiol.*, 58:249-277.
- Fedorcsak I y Ehrenberg L.** (1966) Effects of diethyl pyrocarbonate and methyl methanesulfonate on nucleic acids and nucleases. *Acta Chem Scand.*, 2(1):107-112.
- Franklin KBJ, Paxinos G.** (2007). The mouse brain in stereotaxic coordinates. Third edition.
- Freund T, Buzsaki G.** (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6:347-470.
- Heppner FL, Roth K, Nitsch R, Hailer NP.** (1998). Vitamin E induces ramification and downregulation of adhesion molecules in cultured microglial cells. *Glia*, 22(2):180-188.
- Hindley EL, Nelson AJ, Aggleton JP, Vann SD.** (2014). The rat retrosplenial cortex is required when visual cues are used flexibly to determine location. *Behav Brain Res.*, 263:98-107.
- Howard CV, Reed MG.** (1998). Unbiased stereology: three dimensional measurement in microscopy. Berlin: Springer.
- Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Lee MK, Younkin LH, Wagner SL, Younkin SG, Borchelt DR.** (2004). Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum Mol Genet.*, 13:159-170.
- Jinno S, Aika Y, Fukuda T, Kosaka T.** (1998). Quantitative analysis of GABAergic neurons in the mouse hippocampus, with optical disector using confocal laser scanning microscope. *Brain Res.* 814(1-2):55-70.
- Jinno S, Kosaka T.** (2003). Patterns of expression of neuropeptides in GABAergic nonprincipal neurons in the mouse hippocampus: Quantitative analysis with optical disector. *J Comp Neurol.* 461(3):333-349.
- Jinno S, Kosaka T.** (2006). Cellular architecture of the mouse hippocampus: a quantitative aspect of chemically defined GABAergic neurons with stereology. *Neurosci Res.* 56(3):229-45.
- Livak KJ y Schmittgen TD.** (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25: 402-408.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*, 193(1):265-275.
- Mayhew TM, Jackson MR, Haas JD.** (1986). Microscopical morphology of the human placenta and its effects on oxygen diffusion: a morphometric model. *Placenta* 7(2):121-31.
- Mayhew TM.** (1992). A review of recent advances in stereology for quantifying neural structure. *J Neurocytol.* 21(5):313-28.
- McLean IW, Nakane PK.** (1974). Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixation for immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem.*, 22(12):1077-1083.
- Miyoshi G, Butt SJ, Takebayashi H, Fishell G.** (2007). Physiologically distinct temporal cohorts of cortical interneurons arise from telencephalic Olig2-expressing precursors. *J Neurosci.* 27(29):7786-7798.
- Naber PA, Witter MP.** (1998). Subicular efferents are organized mostly as parallel projections: a double-labeling, retrograde-tracing study in the rat. *J Comp Neurol.*, 393(3):284-297.

- Niewiadomska G, Baksalerska-Pazera M, Riedel G.** (2009). The septo-hippocampal system, learning and recovery of function. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.*, 33(5):791-805.
- Royet JP.** (1991). Stereology: a method for analyzing images. *Prog Neurobiol.* 37(5):433-474.
- Schafer MKH, Eiden LE, Weihe E.** (1998). Cholinergic neurons and terminal fields revealed by immunohistochemistry for the vesicular acetylcholine transporter. I. Central Nervous System. *Neuroscience*, 84(2):331-359.
- Schindowski K, Bretteville A, Leroy K, Bégard S, Brion JP, Hamdane M, Buée L.** (2006). Alzheimer disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits. *Am J Pathol.*, 169(2):599-616.
- Schmitz C, Hof PR.** (2005). Design-based stereology in Neuroscience. *Neuroscience* 130:813-831.
- Semba K.** (2000). Multiple output pathways of the basal forebrain: organization, chemical heterogeneity, and roles in vigilance. *Behav Brain Res.*, 115:117-141.
- Van Groen T, Kadish I, Wyss M.** (2002). Species differences in the projections from the entorhinal cortex to the hippocampus. *Brain Research Bull.*, 57(3-4): 553-556.
- Van Groen T, Miettinen P, Kadish I.** (2003). The entorhinal cortex of mouse: Organization of the projection to the hippocampal formation. *Hippocampus*, 13:133-149.
- Van Strien NM, Cappaert NL, Witter MP.** (2009). The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci.*, 10(4):272-282.
- Wenk GL.** (1997). The nucleus basalis magnocellularis cholinergic system: one hundred years of progress. *Neurobiol Learn Mem.*, 67(2):85-95.
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJG.** (1991). Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec.* 231:482-497.
- Witter MP, Wouterlood FG, Naber PA, Van Haeften T.** (2000). Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network. *Ann Y Acad Sci.*, 911:1-24.
- Witter MP.** (2007). The perforant path: projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus. *Prog Brain Res.*, 163:43-61.
- Wouterlood FG, Pothuizen H.** (2000). Sparse colocalization of somatostatin- and GABA-immunoreactivity in the entorhinal cortex of the rat. *Hippocampus* 10(1):77-86.
- Wu C, Wang Z, Lei H, Zhang W, Duan Y.** (2007). Dual binding modes of Congo red to amyloid protofibril surface observed in molecular dynamics simulations. *J Am Chem Soc.* 129(5):1225-32.
- Wyss JM, Van Groen T.** (1992). Connections between the retrosplenial cortex and the hippocampal formation in the rat: a review. *Hippocampus*, 2(1):1-11.

3.



Resultados y discusión

Una finalidad primordial de este trabajo de Tesis Doctoral ha sido avanzar en la caracterización neuropatológica de modelos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer con objeto de validar su uso en estudios preclínicos. El modelo más ampliamente utilizado en este trabajo ha sido el transgénico PS1_{M146L}/APP_{751SL}, con el que nuestro grupo lleva trabajando desde el año 2003 bajo la subvención del Instituto de Salud Carlos III, Junta de Andalucía y CIBERNED. Esta Tesis Doctoral ha contribuido a aumentar nuestro conocimiento sobre este modelo, y otros modelos, caracterizando la progresión de la patología en la región del subículo dentro del hipocampo así como su uso en la evaluación del potencial terapéutico de un tratamiento oral con litio. Estos resultados se recogen en los Capítulos 3.1 y 3.3, respectivamente, del bloque de Resultados de la Tesis y han sido ya publicados en revistas científicas internacionales del área (los artículos publicados se recogen en los *Anexos 1 y 2*). Asimismo, se ha profundizado en la caracterización de este modelo animal al analizar el proceso neurodegenerativo de los núcleos colinérgicos del telencéfalo basal (Capítulo 3.2). Además, durante estos años de realización de la Tesis he colaborado activamente en otras investigaciones del grupo estrechamente relacionadas con la temática de la Tesis utilizando este mismo modelo animal. Estas investigaciones complementarias han sido fundamentales para el planteamiento y desarrollo del trabajo de Tesis. Estos resultados se han publicado como artículos en diversas revistas científicas (se adjuntan como Anexos 3-7) y los principales descubrimientos se resumen a continuación:

1. Se ha mostrado que el A β extracelular, pero no el intracelular, y la respuesta neuroinflamatoria asociada a éste, son los principales contribuyentes a la pérdida neuronal (neuronas principales e interneuronas SOM/NPY) en la corteza entorrinal a edades tempranas. Es de destacar que a una misma edad cronológica (6 meses de edad), la región del hipocampo y la corteza entorrinal presentaban una activación microglial y un perfil de interleuquinas totalmente opuesto, siendo de fenotipo neuroprotector en el hipocampo y neurotóxico en el área entorrinal, explicando así la temprana muerte neuronal en esta región. Si estas diferencias regionales tiene lugar en los pacientes podrían explicar, en parte, los fracasos terapéuticos con fármacos antiinflamatorios (Moreno-Gonzalez y col., 2009; *Anexo 3*).
2. Este modelo animal posee un proceso neurodegenerativo temprano y selectivo en la región del hipocampo que afecta a las interneuronas que expresan SOM/NPY (células O-LM y HIPP) a los 6 meses de edad. En este trabajo se demuestra que además existe una vulnerabilidad de las interneuronas que expresan la proteína ligadora de calcio calretinina a los 4 meses de edad coincidente con la aparición de placas amiloides (Baglietto-Vargas y col., 2010; *Anexo 4*).
3. Demostramos que la forma soluble de la proteína precursora amilode α (sAPP α), actuando a través de IGF-1, activa la ruta PI3k/Akt y, en consecuencia, ejerce una

acción neuroprotectora, limitando la fosforilación de Tau y la degeneración neuronal. Sin embargo, las formas oligoméricas del A β , presentes en las fracciones solubles del hipocampo de los animales PS1/APP a edades avanzadas, inhiben la inducción de la fosforilación de GSK-3 β por Akt, bloqueando la señalización de las neurotrofinas y por tanto disminuyendo la supervivencia neuronal (Jimenez y col., 2011; *Anexo 5*).

4. El modelo PS1/APP desarrolla una patología axonal temprana en el hipocampo con daño en el citoesqueleto, fallo en el transporte y acumulación de vesículas autofágicas. Estas alteraciones axonales se manifiestan como regiones dilatadas denominadas distrofias, que se asocian estrechamente con los depósitos de amiloide. La presencia de terminales presinápticos distróficos es también una característica patológica del modelo. Estas alteraciones en las estructuras axonales y presinápticas pueden representar el sustrato morfológico de la disfunción hipocampal que precede a la pérdida neuronal y sináptica (Sánchez-Varo y col., 2012; *Anexo 6*).
5. La patología axonal en el hipocampo del modelo PS1/APP se agrava con la edad y se asocia con una disfunción del citoesqueleto y del proceso de proteólisis lisosomal (disminución de actividad de catepsinas B y D). Esta disfunción lisosomal puede ser la responsable de la acumulación de vesículas autofágicas y proteínas ubiquitinadas en las distrofias axonales. Estas alteraciones parecen estar relacionadas con el aumento progresivo con la edad de los niveles de APP y de péptidos de Abeta, conjuntamente con un incremento de las actividades de BACE y γ -secretasa. Éste efecto sobre el metabolismo de APP parece estar directamente implicado en la acumulación sináptica de Abeta, y en consecuencia en la propagación de la patología entre regiones conectadas sinápticamente (Torres y col., 2012; *Anexo 7*).

A continuación se describen los resultados obtenidos en el desarrollo de los objetivos propuestos en el presente trabajo. Estos resultados se han dividido en 5 capítulos específicos, y cada uno de ellos se completa con una discusión y el listado de referencias utilizadas.

Capítulo 3.1: Early neuronal loss and axonal/presynaptic damage is associated with accelerated amyloid- β accumulation in PS1/APP Alzheimer's disease mice subiculum.

Capítulo 3.2: Degeneración de neuronas colinérgicas del telencéfalo basal en modelos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer.

Capítulo 3.3: In vivo modification of Abeta plaque toxicity as a novel neuroprotective lithium-mediated therapy for Alzheimer's disease pathology.

Capítulo 3.4: Evaluación preclínica en un modelo transgénico de Alzheimer del potencial terapéutico de una nueva estatina.

Capítulo 3.5: La delección de IL-4 acelera la patología e induce una respuesta proinflamatoria en un modelo animal transgénico de la enfermedad de Alzheimer.

Trujillo-Estrada L, Dávila JC, Sánchez-Mejias E, Sánchez-Varo R, Gomez-Arboledas A, Vizuete M, Vitorica J, Gutiérrez A. (2014). Early neuronal loss and axonal/presynaptic damage is associated with accelerated amyloid- β accumulation in A β PP/PS1 Alzheimer's disease mice subiculum. *J Alzheimers Dis.*, 42(2):521-541.

3.1.

Early neuronal loss and axonal/presynaptic damage is associated with accelerated amyloid- β accumulation in PS1/APP Alzheimer's disease mice subiculum (ver Anexo 1)

INTRODUCTION

The progressive cognitive decline that ultimately leads to dementia in Alzheimer's disease (AD) is consequence of a severe loss of synapses and neurons that selectively affects particular cell subpopulations in brain areas critical for learning and memory (Davies et al., 1987; Terry et al., 1991; Gomez-Isla et al., 1996; Masliah et al., 2001; Price et al., 2001; Scheff et al., 2006). Although transgenic mice, based on the over-expression of proteins harboring one or several mutations found in familial AD, progressively develop amyloid- β (A β) deposits and tau hyperphosphorylation, along with dystrophic neurites and activated astrocytes and microglia, very limited or none neuronal death has been reported in vulnerable brain areas of these AD models (Schaeffer et al., 2011; Kitazawa et al., 2012; LaFerla and Green, 2012; Platt et al., 2013). This lack of significant neuronal loss is, in fact, the major shortcoming of AD models for the preclinical evaluation of drugs that could have greater potential in patients to alleviate or prevent this disease. Therefore, the characterization of the neurodegenerative phenotype of AD models is a critical step in ensuring success for translating therapeutic efficacy.

The hippocampal formation, a key structure of the medial temporal lobe memory system and one of the earliest regions to be affected in AD, consists of a number of subdivisions including the dentate gyrus, the hippocampus proper (areas CA1 and CA3), the entorhinal cortex (EC) and the subiculum (Amaral and Witter, 1989; O'Mara et al., 2001; O'Mara, 2005). Marked neuronal reduction occurs in the hippocampal formation of AD patients (Davies et al., 1992; West, 1993; Ball, 1977; Bobinski et al., 1997; Simic et al., 1997; West et al., 2000; Kril et al., 2002; West et al., 2004). Even in mild AD, a marked neuronal loss can be found in the entorhinal cortex and hippocampus (Gomez-Isla et al., 1996; Price et al., 2001), and these changes result in decreased volume of these brain areas (Bobinski et al., 1996; Franko and Joly, 2013). Unlike most transgenic animal models, which do not exhibit the neurodegenerative spectrum of disease observed in the patient population, in the PS1M146L/A β PP751SweLondon (PS1/APP) mice we have previously reported a selective and significant neuronal loss in the hippocampus proper, dentate gyrus and entorhinal cortex. Subpopulations of GABAergic interneurons were selectively affected at early ages in hippocampal CA fields and dentate gyrus (Ramos et al., 2006; Baglietto-Vargas et al., 2010) as well as entorhinal cortex (Moreno-Gonzalez et al., 2009). However, pyramidal neurons were first affected in entorhinal cortex (Moreno-Gonzalez et al., 2009) and then later in CA1 hippocampus (Jimenez et al., 2008), similarly to the pathological pattern described in patients (Gomez-Isla et al., 1996; Killiany et al., 2002; Pennanen et al., 2004). The loss of these neurons was associated to the prominent extracellular amyloid pathology along with the age-dependent increase in the soluble oligomeric A β content and/or the induced cytotoxic inflammatory response (Jimenez et al., 2008; 2011).

In contrast to the rest of the hippocampal formation, the subiculum has received comparatively little investigation in AD field. The subiculum is the principal target of the CA1 pyramidal cells and serves as the major output structure of the hippocampal formation to widespread subcortical and cortical areas (see review Ding, 2013). In AD patients, the subiculum is among the earliest regions displaying severe atrophy and pathology (Hyman et al., 1984; Davies et al., 1987; Davies et al., 1988; Van Hoesen and Hyman, 1990; Davies et al., 1992; Simic et al., 1997; Falke et al., 2003; Apostolova et al., 2006; La et al., 2013). Loss of the subicular neurons has been reported to be associated with clinical AD (West, 1993; West et al., 2004). Thus, damaged hippocampal–cortical and hippocampal–subcortical communication might be significant for the memory impairment seen in patients. In AD models, tremendous attention has been focused on hippocampal (CA fields and dentate gyrus) pathology, however very few studies comment specifically on subiculum neurodegeneration so far (Oakley et al., 2006; Eimer and Vassar, 2013).

Here we have characterized the histopathological events in the subiculum of the PS1M146L/A β PP751SweLondon model by immunohistochemistry and stereological approaches to detect changes in the number of neurons. Our data indicate that the

subiculum is the earliest affected hippocampal region showing a selective loss of both principal cells and SOM-positive interneurons since early ages (4-6 months) in parallel with an early onset of extracellular amyloid deposits and prominent axonal damage. The most relevant feature of this model is the selective AD-like neurodegenerative phenotype in highly AD-vulnerable regions. Therefore, this model can be very useful for testing the therapeutic ability of potential compounds to protect neurons and ameliorate disease symptoms due to this neurodegenerative phenotype.

RESULTS

3.1.1. Selective loss of subicular interneurons at early ages

We have first determined the numerical density of SOM-immunostained neurons in the subiculum (including pro-subiculum) of PS1/APP at 2, 4, 6 and 12 months of age and compared to age-matched PS1 and WT mice. The initial immunohistochemical analysis showed that the majority of subicular SOM-containing cells were located in the deep pyramidal cell layer and in the polymorphic layer (Fig. 3.1.1A1-A3). These interneurons (see inset in Fig. 3.1.1A2), corresponding to O-LM cells of hippocampal sector CA1, innervate the distal apical dendrites of pyramidal neurons in the outer molecular layer which receives the main excitatory input from layer III of the medial entorhinal cortex. WT and PS1 animals displayed a similar pattern of SOM-immunolabeling. However, PS1/APP mice (Fig. 3.1.1B1-B3) showed a reduced number of labeled somata since early ages (4-6 months) and the presence of numerous SOM-positive dystrophic neurites (see inset in Fig. 3.1.1B2), mostly located around amyloid plaques. The stereological study (Fig. 3.1.1C) demonstrated a significant decrease ($-27.17 \pm 8.50\%$, Tukey $p < 0.05$) in the numerical density (neurons/mm³) of SOM-positive cells in PS1/A β PP mice at 4 months of age compared to age-matched WT group. This decrease was much more marked at 6 months of age ($-69.37 \pm 8.53\%$, Tukey $p < 0.05$). No further decrease was detected at 12 month-old ($-69.15 \pm 3.05\%$, Tukey $p < 0.05$). PS1 group did not show changes respect to WT group at any age tested. These data were in line with our previous reports showing a significant loss of SOM interneurons in the hippocampus proper (CA1-CA3 and dentate gyrus) and entorhinal cortex of our PS1/APP model at 6 months of age (Ramos et al., 2006; Moreno-Gonzalez et al., 2009).

We have also analyzed whether another major interneuron population, the cells expressing the calcium binding protein parvalbumin (PV), which include basket and axo-axonic GABAergic neurons, was also early affected in the subiculum of our AD model. PV-positive interneurons were present throughout the principal cell layer of the subiculum (Fig. 3.1.2A-B). We have not found significant differences in the numerical density (Fig. 3.1.2C) of this GABA population at 6 months of age between PS1/APP (8415.58 ± 1429.79 cells/mm³) and WT (10721.93 ± 3057.86 cells/mm³) mice and neither at the advanced age

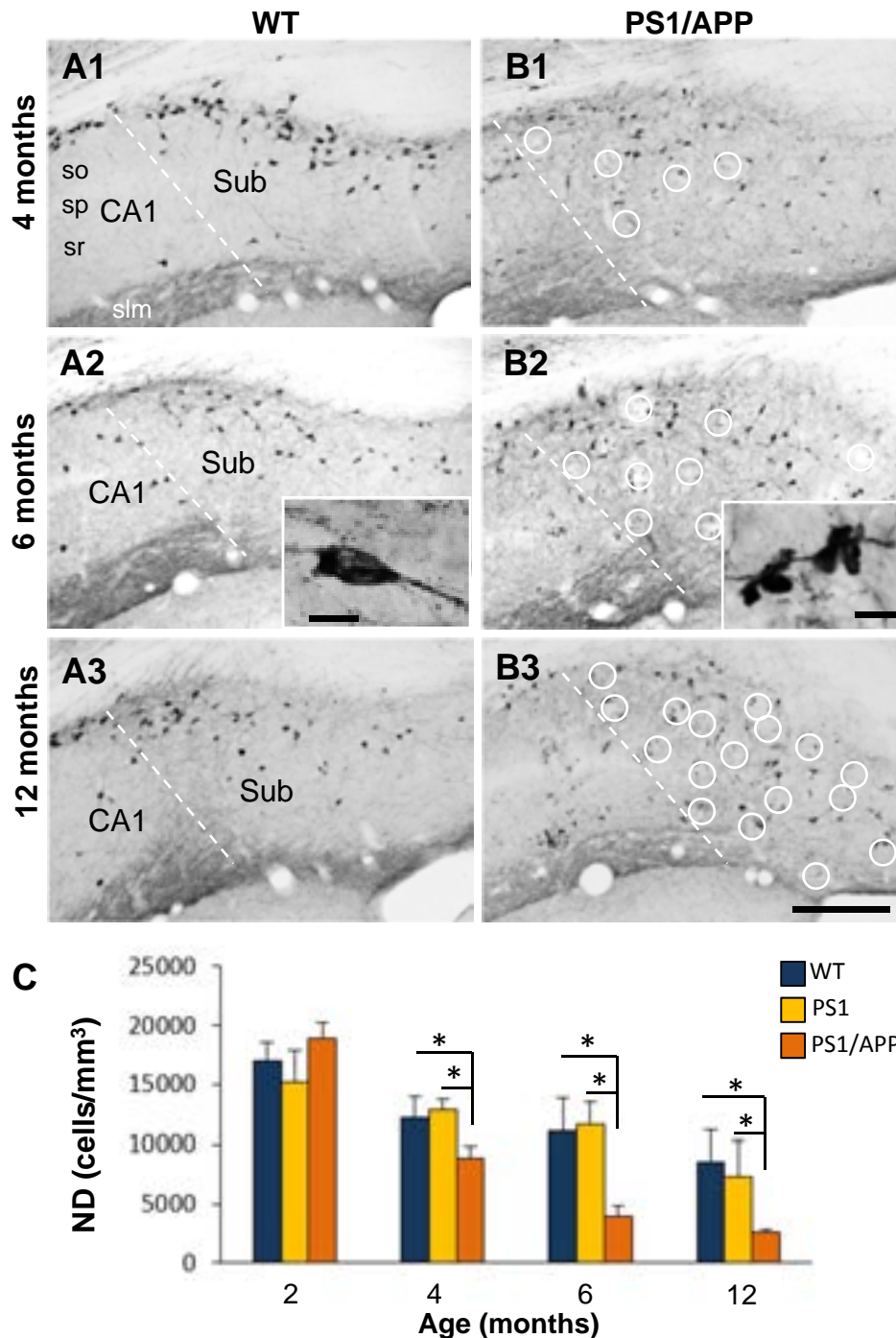


Figure 3.1.1. Significant reduction of subicular SOM-interneurons in PS1/APP mice at early ages. Light microscopy images of SOM immunoreactivity in the subiculum of WT (A1-A3) and PS1/APPP (B1-B3) mice at 4, 6 and 12 months of age. SOM-positive neurons were located in the deep pyramidal cell layer and in the polymorphic layer (an immunoreactive neuron is shown at higher magnification in A2 insert). A decrease in the number of immunoreactive somata was observed in PS1/APP mice. Abundant immunoreactive dystrophic neurites (higher magnification detail is shown in B2 insert) were seen associated to amyloid plaques (indicated with open white circles) in the double tg mice. The number of dystrophies clearly increased with age. Stereological quantification (C) of SOM-positive neurons in WT, PS1 and PS1/APP mice at 2, 4, 6 and 12 months of age (n=4 per genotype and age). Results showed a significant decrease in the density of SOM-immunoreactive somata (cells/mm³) in PS1/APP mice compared to WT-PS1 since 4 months of age. Data (mean±SD) was analyzed by one-way ANOVA p<0.01 (F(14,24)=24,3), followed by Tukey post-hoc multiple comparison test. Significance (*p<0.05) was indicated in the figure. No differences were detected between PS1 and WT animals. Scale bars: A-B, 200 μm; insets 14 μm. Sub: *subiculum*.

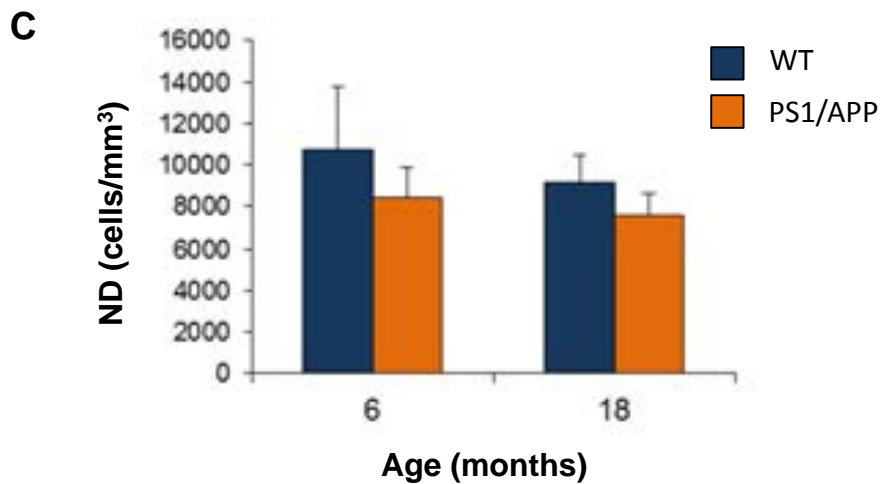
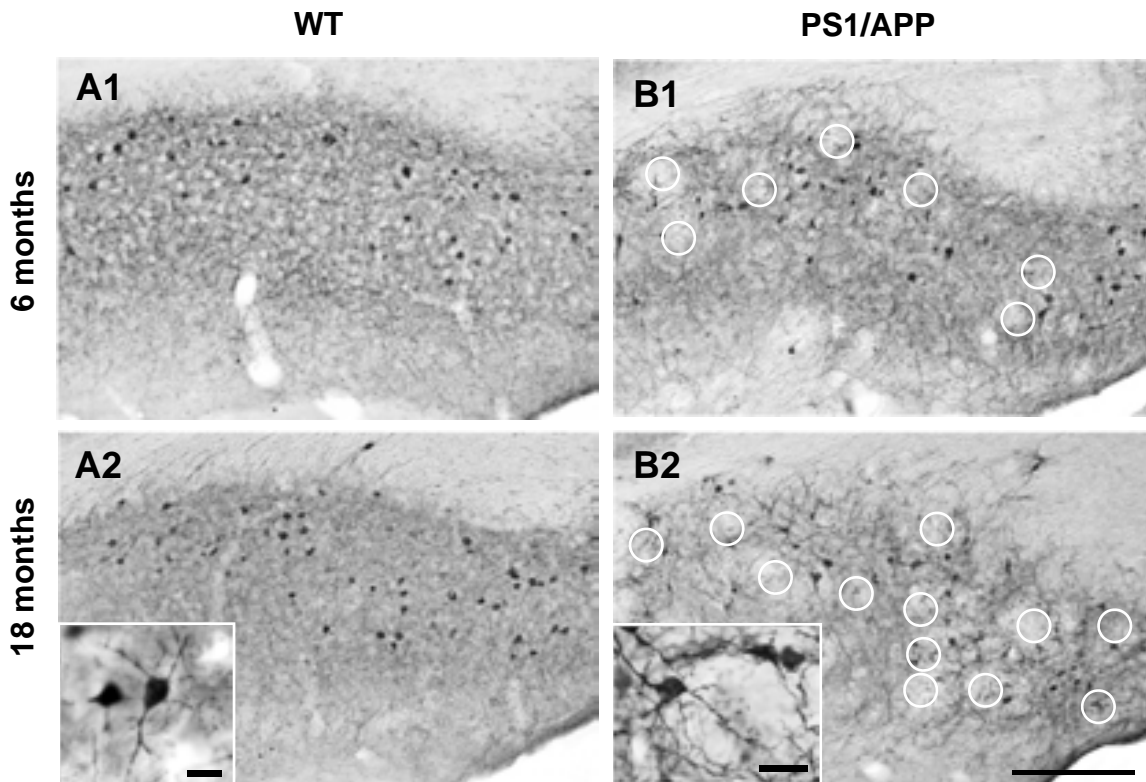


Figure 3.1.2. PV-interneurons are resistant to neurodegeneration in PS1/APP subiculum. Light microscopy images of PV immunoreactivity in the subiculum of WT (A1 and A2) and PS1/APP (B1 and B2) at 6 and 18 months of age. No changes were detected between both genotypes in the number and morphology of these inhibitory neurons. Immunolabeled PV-neurons are shown at higher magnification in A2 inset. PV-neurons located near A β plaques in PS1/APP mice displayed normal morphology as shown in B2 inset. Open white circles indicate areas occupied by A β plaques (not stained) in PS1/APP subiculum. Stereological quantification (C) of PV-positive neurons (cells/mm³) at 6 and 18 months of age in WT and PS17APP mice revealed no significant differences between the genotypes at the two ages examined. Scale bars: A-B, 200 μ m; insets 14 μ m.

of 18 month-old (7556.79 ± 1033.90 vs 9136.28 ± 1205.44 cells/mm³ for PS1/APP and WT mice, respectively). Moreover, and unlike SOM-cells, the neuronal population positive for PV did not develop dystrophic neurites with the progression of age. In fact, even the PV-immunopositive processes and somata that were located in the very near proximity of amyloid plaques displayed a normal morphology (see Fig. 3.1.2B2).

These findings indicated that in the subiculum of this AD model the SOM interneurons, but not the PV-cells, were highly vulnerable at the initial stages of the disease and that the degenerative process of the SOM population preceded the observed in the hippocampus and entorhinal cortex.

3.1.2. Loss of subicular principal neurons at early ages

Though in this AD model the loss of hippocampal principal neurons is a late event (17-18 months of age) (Schmitz et al., 2004; Jimenez et al., 2008) in the entorhinal cortex pyramidal neurodegeneration begins at early ages (6 months) (Moreno-Gonzalez et al., 2009). Therefore, we next examined whether subicular principal neurons were also early affected by determining their numerical density at 2 and 6 months of age in comparison with age-matched PS1 and WT animals. To specifically distinguish principal cells from interneurons, we have performed a multiple immunoperoxidase labeling approach as previously reported (5x immunolabeling) (Moreno-Gonzalez et al., 2009). Principal cells were discriminated by a single NeuN-nuclei labeling in light brown color whereas interneurons (those expressing SOM/PV/CR/VIP alone or in combination) displayed also a dark-blue cytoplasmic labeling (see Fig. 3.1.3 and for details see insets).

As shown in Fig. 3.1.3, the microscopic observation of the 5x immunolabeled sections at 2 and 6 months of age revealed no qualitative differences in the immunostaining pattern and cell distribution between PS1/APP and PS1 or WT animals. Small rounded areas devoid of cells and characterized by the presence of dystrophic neurites (in this case only GABAergic dystrophies), which corresponded to areas occupied by amyloid plaques, were easily detected in PS1/APP animals, few plaques at 2 months (Fig. 3.1.3A3) and more numerous at 6 months of age (Fig. 3.1.3B3), as expected. The quantitative stereological study (Fig. 3.1.3C) revealed a significant (-28.04 ± 11.76 %; $p < 0.05$) principal cell loss in PS1/APP mice (compared to PS1 and non-transgenic littermates) at 6 months of age. No differences were detected at 2 months of age. These data demonstrated that principal subicular neurons were vulnerable at early ages and the first hippocampal pyramidal neurons to be affected by the course of the disease.

3.1.3. Accelerated intra- and extracellular A β accumulation in the subiculum

Considering the toxic effect of A β accumulation on neuronal survival we next investigated the temporal intra/extracellular expression of A β in the subiculum of the

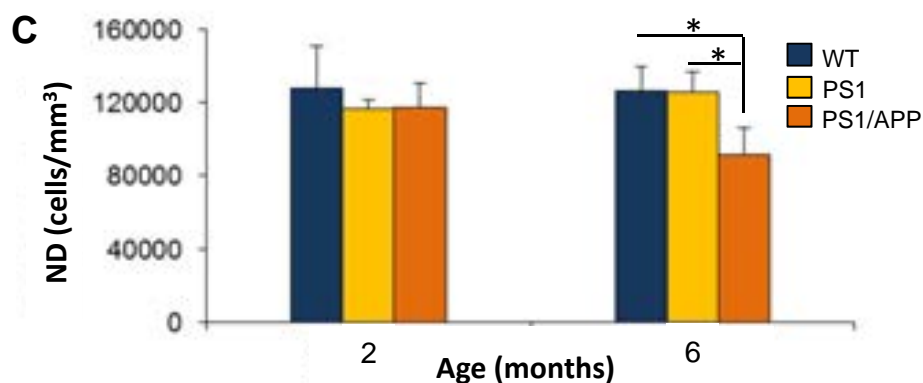
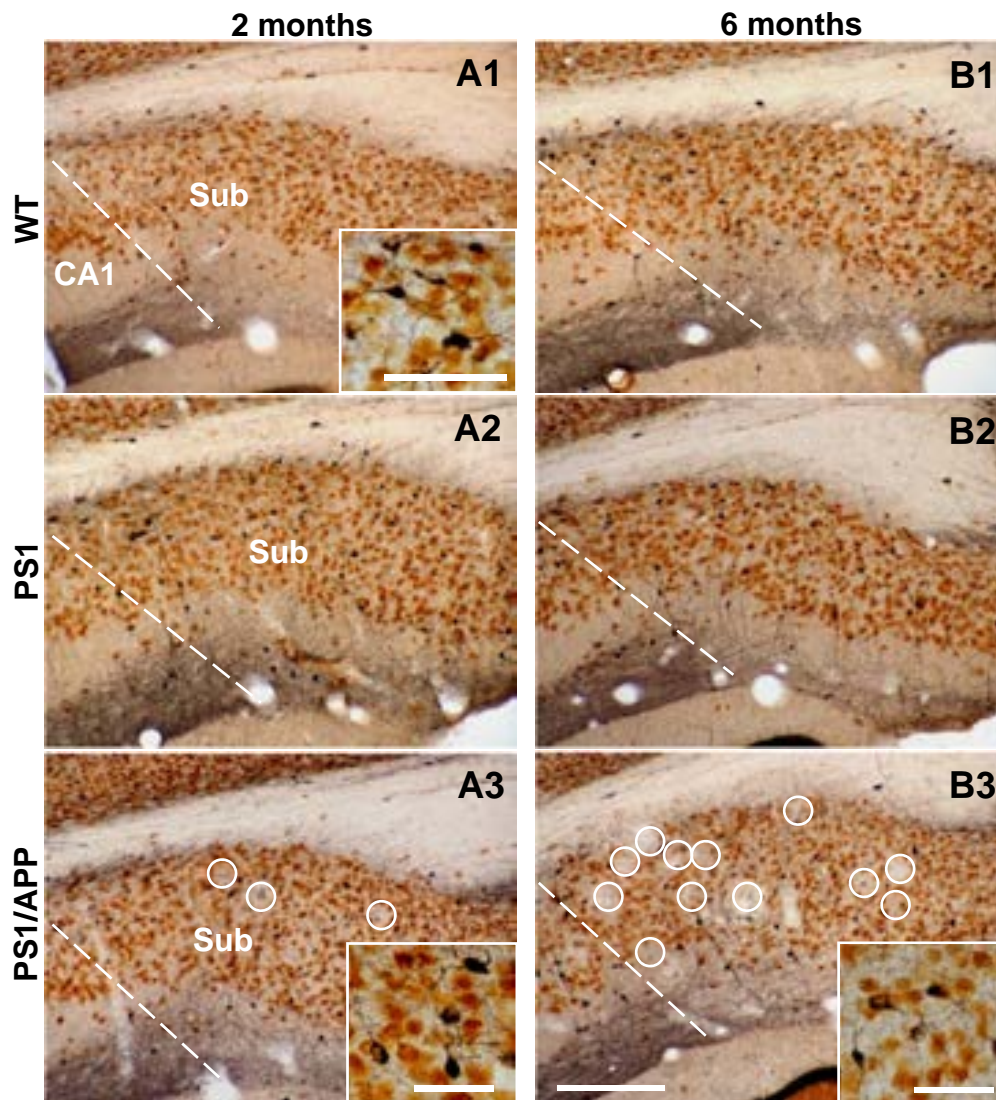


Figure 3.1.3. Loss of principal neurons in the PS1/APP subiculum at early ages. Multiple 5x (SOM, PV, CR, VIP and NeuN)-immunolabeling in the subiculum, of WT (A1 and B1), PS1 (A2 and B2) and PS1/APP (A3 and B3) mice at 2 and 6 months of age. Principal neurons (single NeuN-labeled cells in brown colour) were immunohistochemically differentiated from interneurons (SOM/PV/CR/VIP-labeled cells in dark blue colour) as seen in the higher magnification images of the insets. Stereological counts (C) of principal cells revealed a significant (two tailed t-test, $p < 0.05$) decrease in the density (neurons/mm³) of this cell population in the PS1/APP subiculum compared to age-matched WT or PS1 mice at 6 months of age. No differences were found at 2 months of age. Data are given as mean+SD. Open white circles indicated amyloid plaques location in the PS1/APP subiculum. Scale bars: A-B, 200 μ m; insets in A1 and A3, 100 μ m; inset in B3, 50 μ m. Sub: *subiculum*.

double transgenic model from 2 to 12 months of age by A β 42 immunohistochemistry (Fig. 3.1.4). Similar results were obtained with the OC antibody for the oligomeric forms of A β (results not shown). As shown in the panoramic images (Fig. 3.1.4A-C), the subiculum is one of the earliest forebrain regions to express and accumulate A β . At 2 months of age the presence of intracellular A β was clearly seen in subicular neurons which presented a strong punctuate immunolabeling (Fig. 3.1.4A and D, and for a detail see insert in D). We did not check in younger animals, but most probably the intracellular A β accumulation in subiculum started before 2 months of age. The formation of extracellular A β deposits was also first observed in this area at 2 months of age, however the number of plaques was really low indicating that the onset of extracellular amyloid pathology was at the initial stage. At 4 months, numerous plaques were already formed in the subiculum (Fig. 3.1.4E) and further on the number and size of these deposits significantly increased, as shown here for 6 and 12 months of age (Fig. 3.1.4F and G, respectively). As rapidly increased the extracellular accumulation of A β the presence of intraneuronal A β in the somata tended to decrease. In fact, it was really difficult to distinguish A β -positive somata at light microscopy from 6 months onwards due to the high amount of extracellular amyloid deposits occupying the subiculum.

To quantitatively compare the extracellular amyloid progression with age in the subiculum with other highly vulnerable brain areas, such as CA1 and entorhinal cortex, we have measured the area occupied by the A β deposits (plaque loading) in these brain regions using Thioflavin S stained sections (images no shown). Thioflavin S labeled only extracellular A β and allowed better image analysis quantification of plaques since intracellular A β pool was excluded. As shown, the subiculum (Fig. 3.1.5A) is the earliest and most severely affected area by the extracellular amyloid pathology. The subicular amyloid load was $0.06 \pm 0.1\%$ and $2.77 \pm 1.17\%$ at 2 and 4 months of age respectively. A β deposition increased to $8.67 \pm 1.70\%$ at 6 months of age and reached to $14.57 \pm 6.3\%$ at 12 months (the maximum was at 18 months with $25.31 \pm 4.10\%$, not shown). A β load was significantly greater in subiculum than in CA1 and entorhinal cortex at all ages analyzed. At 4 months of age, the subicular amyloid deposition was markedly accelerated and reached up to 5 times higher than in CA1 and 7 times than in entorhinal cortex. Then after, at 6 and 12 months, the plaque load in subiculum, was between 3-4 times higher than in CA1 or entorhinal cortex. Therefore, the subiculum showed the greatest age-related A β load and also exhibited the earliest neuronal loss.

The age-dependent increase in the total amyloid load in the subiculum appeared to be associated with both the number and size of the plaques. To support this observation, we next determined the plaque density (plaque/mm²) dissected into four size categories ranging from $<200 \mu\text{m}^2$ to those $>2000 \mu\text{m}^2$ (Fig. 3.1.5B), as well as the percent of each plaque category (Fig. 3.1.5C), at 2, 4, 6 and 12 months of age. The appearance of plaques

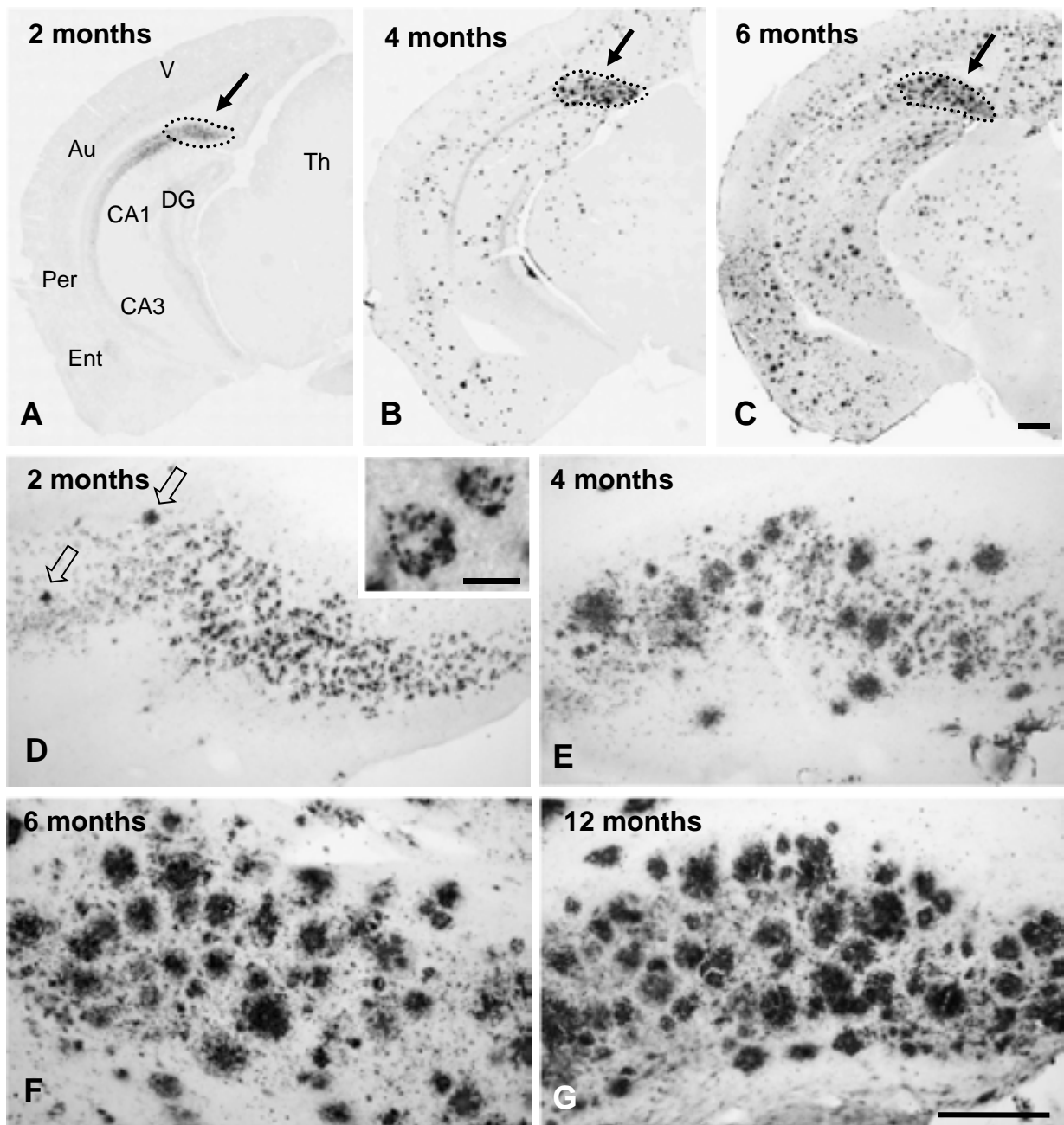


Figure 3.1.4. Early accelerated intra- and extracellular A β accumulation in the PS1/APP subiculum. A β 42 immunohistochemistry at 2 (A and D), 4 (B and E), 6 (C and F) and 12 (G) months of age. A-C, panoramic views of the caudal telencephalon showing the A β 42 immunoreactivity in the subiculum (dashed area pointed with a black arrow) compared to other hippocampal and cortical areas from 2 to 6 months. Intracellular A β appears as early as 2 months and neurons show a punctate labeling suggestive of a vesicular location (inset in D). Abundant A β plaques were already seen at 4 months of age and plaques progressively increased, in number and size, with age. Scale bars: A-C, 500 μ m; D-G, 200 μ m; inset in D, 10 μ m. CA1, CA3, hippocampal subfields; DG, dentate gyrus; Ent, entorhinal cortex; Per, perirhinal cortex; Au, auditory cortex; V, visual cortex; Th: thalamus.

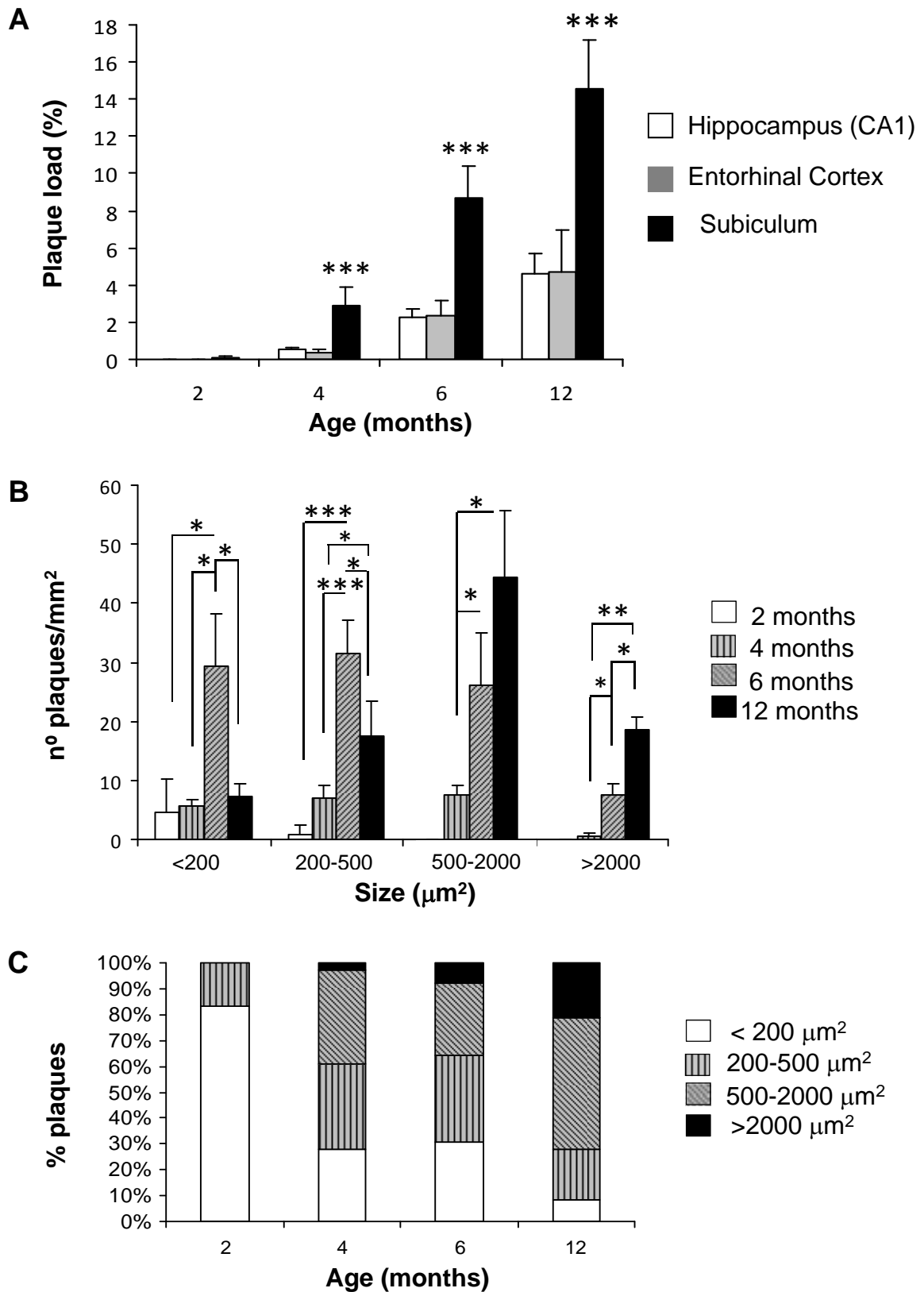


Figure 3.1.5. A β load and plaque progression with age in PS1/APP subiculum. A) A β load in subiculum rapidly increased with age and it was significantly higher than in CA1 and entorhinal cortex at all ages analyzed. B and C) The number (plaques/mm²) and the size (μm^2) of the A β plaques in the subiculum exhibited a marked increase with age (two tailed t-test, * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).

in this region begun at 2 months of age and they were mostly under $200 \mu\text{m}^2$, and then progressively increased in number at 4 months with the formation also of bigger plaques. However, the most significant increase in the number of plaques/ mm^2 was at the age of 6 months for each size category (5, 4.6, 3.4 and 14.5 times higher than at 4 months for those plaques <200 , $200-500$, $500-2000$ and $>2000 \mu\text{m}^2$ respectively, $n=5$, two tailed t-test, $p<0.05$), being most abundant those $<500 \mu\text{m}^2$. Interestingly, at 12 months the plaque distribution switched and the predominant plaque size was $>500 \mu\text{m}^2$. Then, our data demonstrated that the number of plaques significantly build-up with age, but most remarkable, plaque size also displayed a striking increment.

Since intraneuronal $A\beta$ accumulation precedes amyloid plaque formation in the subiculum, we further investigated the $A\beta$ expression in subicular neurons as a potential toxic agent to induce the neurodegeneration. The early presence of intraneuronal $A\beta$ in $A\beta\text{PP}$ -positive cells was confirmed by double $A\beta 42/\text{hA}\beta\text{PP}$ immunofluorescence labeling (Fig. 3.1.6A1-A3) in 2-month-old PS1/APP mice. These $A\beta\text{PP}$ -positive cells corresponded to principal neurons since the mutated human $A\beta\text{PP}$ transgene is expressed only by this population in the transgenic mice used. It can be argued then that this early accumulation of $A\beta$ within principal cells could be responsible of their vulnerability. However, SOM-positive interneurons were also highly affected at early ages, and these cells did not accumulate intracellular $A\beta$ (Fig. 3.1.6B1-B3), since they do not express the mutated human $A\beta\text{PP}$. Therefore, it is very unlikely that the neuronal loss in the subiculum, at least for interneurons, was induced by the intracellular $A\beta$.

As shown here, the labeling of $A\beta 42$ and $\text{hA}\beta\text{PP}$ just marginally overlaps in the same subcellular compartments. In fact, only $3.36\pm 1.79\%$ ($n=30$ cells) of $A\beta 42$ co-localized with $\text{hA}\beta\text{PP}$. This demonstrated the specificity of the $A\beta$ antibody, since it does not cross-react with the $A\beta\text{PP}$ antibody and that $\text{hA}\beta\text{PP}$ processing and $A\beta$ accumulation should take place in different intracellular compartments. In this sense, the punctuate labeling of the $A\beta 42$ antibody was suggestive of vesicular location. Several studies have reported the preferential location of $A\beta$ in vesicles of the endosome-lysosome system (Eimer and Vassar, 2013) including autophagy vesicles (Sanchez-Varo et al., 2012; Torres et al., 2012). Confocal images of double $A\beta 42/\text{cathepsin-D}$ labeling (Fig. 3.1.6C1-C3) indicated that most of the $A\beta$ was in fact associated with lysosomal structures in the somata of the principal subicular neurons. Quantitative analysis demonstrated that $88.9\pm 18.2\%$ ($n=50$ cells) of the intracellular $A\beta 42$ labeling co-localized with cathepsin-D. Thus, $A\beta$ is accumulated preferentially in lysosomal vesicles. Furthermore, immunogold electron microscopy experiments demonstrated a restricted location of $A\beta$ within endolysosomal subcellular compartments of the principal neuronal somata (Fig. 3.1.6D-G). Immunogold labeled organelles displayed an electron-dense granular content typical of

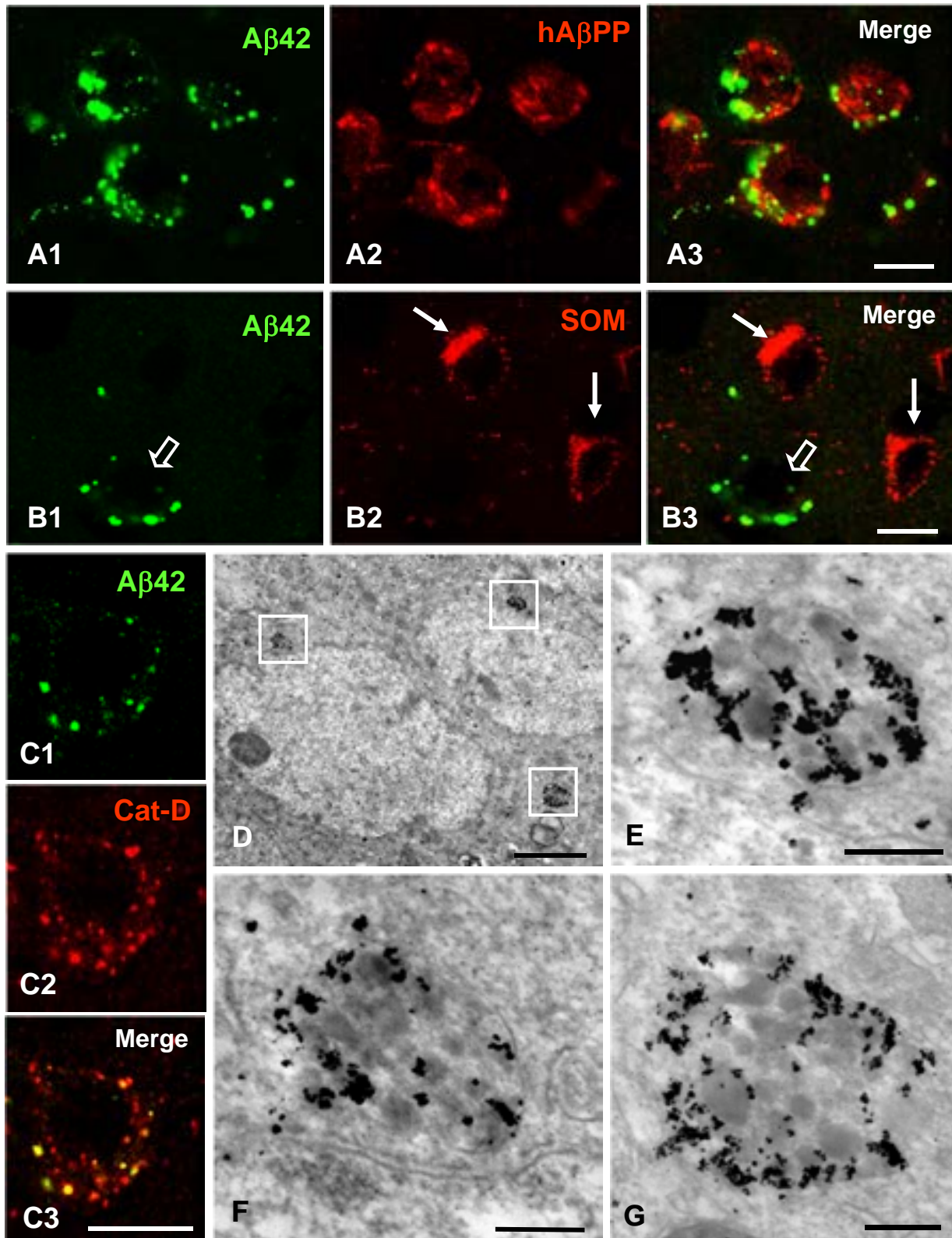


Figure 3.1.6. Intracellular Aβ is mostly localized in lysosomal vesicles of principal cells. Double confocal immunofluorescence labelings show the presence of Aβ in AβPP-positive (principal) neurons (A1-A3) but not in SOM-interneurons (B1-B3). Most Aβ42 was localized in lysosomal vesicles as shown by double Aβ42/Cathepsin-D labeling and confocal microscopy (C1-C3). Aβ immunogold electron microscopy reveals the restricted subcellular location of Aβ within endolysosomal organelles of principal neuronal cell bodies. Scale bars: A-C, 10 μm; D, 2 μm; E-G, 0.2 μm.

endolysosomes (see higher magnification images in Fig. 3.1.6E-G).

3.1.4. A β plaques as inductors of early axonal/presynaptic pathology in the subiculum

The pathogenic mechanisms leading to neuron loss in AD has not been completely elucidated yet, and the extracellular amyloid deposits could be major contributors for neuronal damage/loss. In our model, the hippocampal plaques are surrounded by numerous dystrophic neurites of axonal/presynaptic origin (Sanchez-Varo et al., 2012; Torres et al., 2012). Then, we next examined the dystrophy pathology in the subiculum and its association with amyloid plaques using light and electron microscopy approaches. The formation of plaques in the subiculum was paralleled with the appearance of dystrophic neurites in their very close periphery. The hA β PP antibody is a well-established marker for dystrophies (Fig. 3.1.7A), and in our model labeled dystrophies belonging to glutamatergic cells as we show here with the double labeling A β PP/VGLUT1 (see Fig. 3.1.7E1-E3). While no dystrophic dendrites around plaques were detected with MAP2 immunostaining (Fig. 3.1.7B), numerous dystrophic neurites were labeled with different axonal/synaptic markers such as NF (Fig. 3.1.7C), synaptophysin (Fig. 3.1.7D), VGLUT1 (Fig. 3.1.7E2) and VGAT (Fig. 3.1.7F). In addition, we observed SOM-positive (7G) or ChAT-positive (7H) axonal dystrophies surrounding subicular plaques. All together, these data confirmed the axonal origin of the dystrophies that surround plaques in the subiculum.

We and others have reported the accumulation of autophagy vesicles within dystrophies (Nixon et al., 2005; Lee et al., 2011; Sanchez-Varo et al., 2012; Torres et al., 2012). This abnormal collection of vesicles belonging to the autophagy-lysosome degradation system might result from a defective cytoskeleton-mediated transport. We have next checked whether subicular dystrophies displayed immunoreactivity for LC3 (autophagy marker), ubiquitin (marker for protein degradation) and AT8 (phosphorylated tau). As shown in Fig. 3.1.7 (I-K), these axonal dystrophies were strongly labeled with all these markers suggesting a focalized altered microtubule vesicular transport that compromise protein degradation with the subsequent accumulation of vesicles and undegraded proteins that disrupts axonal structure.

A direct toxic effect of the A β plaques on surrounding axons might be the cause of dystrophic formation. In fact, the confocal microscopy evaluation of double A β 42/synaptophysin labeling (Fig. 3.1.8A) revealed a very close spatial association between both markers with the extracellular A β encircling, almost wrapping, the synaptophysin-positive dystrophies. For a better resolution we next evaluated this tight association between plaque and dystrophies at the transmission electron microscopy (Fig. 3.1.8B-D). Fig. 3.1.8B shows a typical amyloid plaque in this model (neuritic plaque), completely surrounded by numerous dystrophic neurites. In their periphery, plaques gave off many long branches coming in close contact with the dystrophies (Fig. 3.1.8C and D).

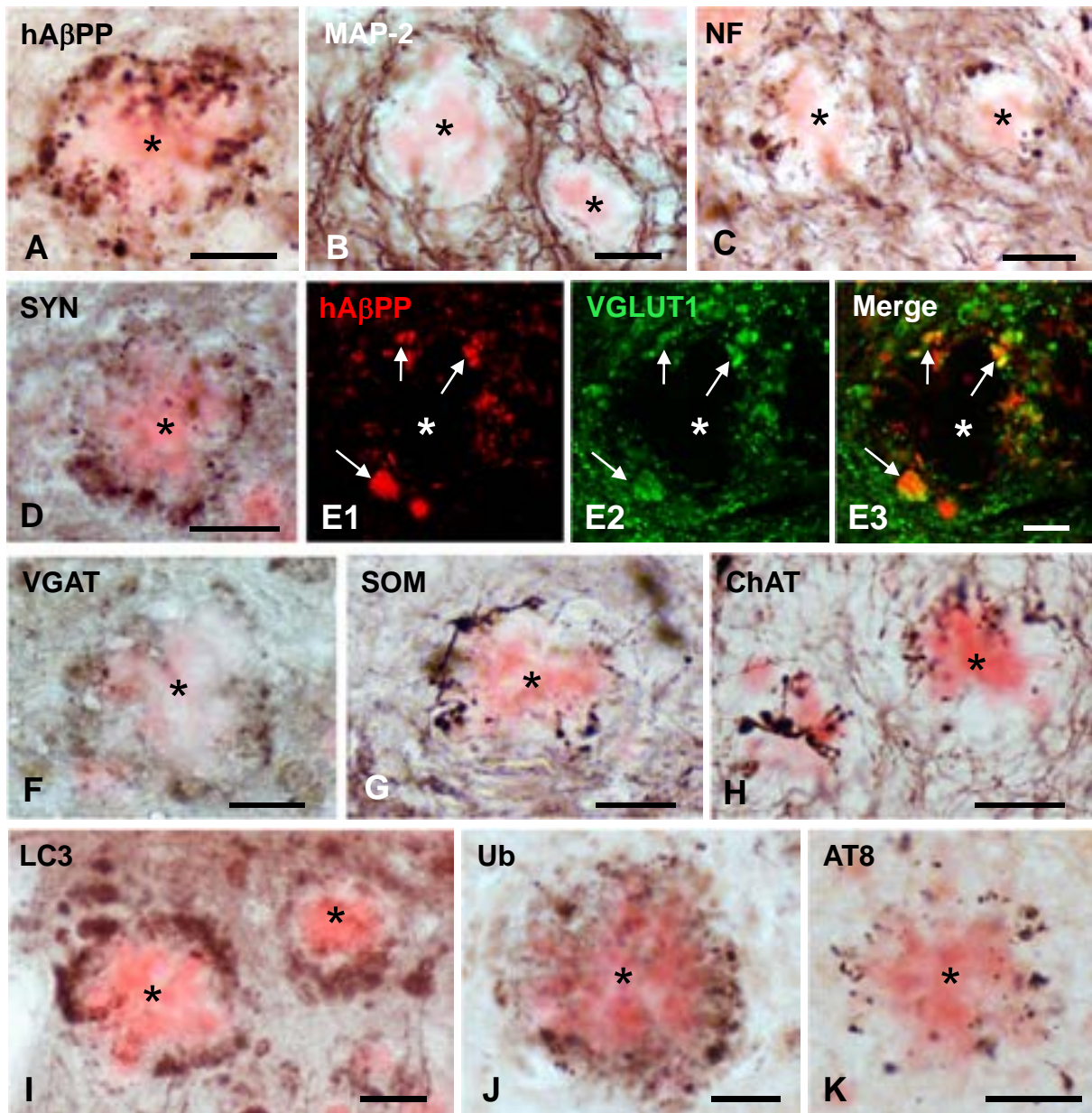


Figure 3.1.7. A β plaques are closely surrounded by axonal/synaptic dystrophies containing phospho-tau and autophagy vesicles. A) A β plaque (Congo red-stained) surrounded by numerous dystrophic neurites immunopositive for hA β PP antibody. B) Dystrophic neurites were not immunopositive for MAP-2 (dendritic marker). C) Immunoreactivity for neurofilament (axonal marker) was found in dystrophic neurites surrounding plaques. D) Plaque associated dystrophies were immunoreactive for synaptophysin (synaptic marker). E1-E3) Confocal double immunofluorescence labeling for hA β PP (red) and VGLUT1 (green) shows extensive co-localization (arrows) of the two markers indicating the axonal/synaptic glutamatergic nature of hA β PP-positive dystrophic neurites around plaques. F-H) Congo red-stained plaques were surrounded by axonal/synaptic dystrophies immunopositive for VGAT (marker for GABAergic terminals), somatostatin (marker for a GABAergic subpopulation) and ChAT (cholinergic marker). I-K) Dystrophies around plaques were immunolabeled for the autophagy marker LC3, ubiquitin and phospho-tau (AT8). Asterisks indicate A β plaques. Scale bars: A-D and F-K, 25 μ m; E, 10 μ m.

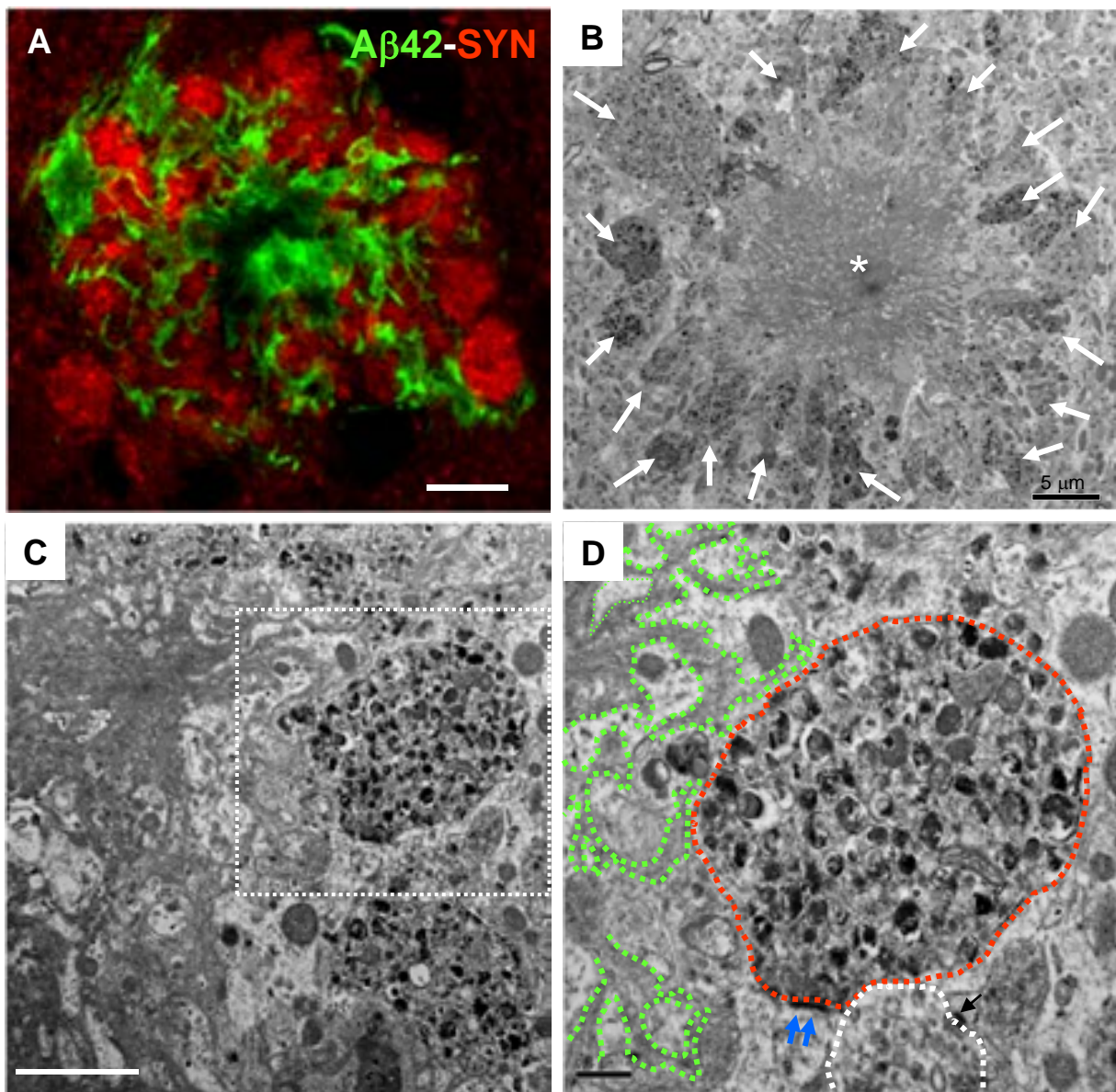


Figure 3.1.8. Tight association between extracellular A β and synaptic dystrophies. A) Double confocal A β 42 (green) and synaptophysin (SYN, red) labelling show how A β threads from a plaque closely cover SYN-positive dystrophies. B) Electron microscopy micrograph of an A β plaque (asterisk) surrounded by numerous dystrophic neurites (white arrows). C) An electron microscopy image of the plaque periphery showing dystrophic neurites in close contact with A β threads. D) is a higher magnification image of the squared area in C; a dystrophic presynaptic terminal (outlined with red line), contacting with a normal postsynaptic element (postsynaptic density is pointed with blue arrows), is in the very close proximity of A β threads (outlined in green colour). Scale bar: A, 10 μ m; B, 5 μ m; C, 2 μ m; D, 0.5 μ m.

Dystrophies were morphologically characterized by the presence of multiple heterogeneous autophagy-like vesicles, as expected.

The early axonal defects in the subiculum of this AD model could directly affect presynaptic terminals. Though the plaque-associated dystrophies were labeled with the synaptic marker synaptophysin, this labeling could be due to the abnormal accumulation of this protein along the axon due to transport failure, and not to be present in synaptic boutons. However, EM examination revealed that presynaptic terminals were indeed dystrophic (Fig. 3.1.8D) and displayed abnormal morphology with huge collection of autophagy/lysosomal vesicles. Though these dystrophic terminals made contact with normal postsynaptic elements their function and viability could be somehow compromise.

These data demonstrated the existence of an early axonal/synaptic pathology in the subiculum of this AD model that may represent the beginning of synaptic disruption and loss.

DISCUSSION

Neuron loss is the best anatomopathological substrate that correlates with cortical atrophy and dementia during disease progression in AD. However, most transgenic animals do not display this fundamental degenerative feature of patients. To evaluate the effectiveness of potential neuroprotective therapies for AD, it is essential that animal models exhibit neuronal damage/dysfunction, and even most importantly neuronal death, relevant to the disease in vulnerable brain regions and cell populations. The present work provides new evidences, and further support our previous studies (Ramos et al., 2006; Jimenez et al., 2008; Moreno-Gonzalez et al., 2009; Baglietto-Vargas et al., 2010; Jimenez et al., 2011; Sanchez-Varo et al., 2012; Torres et al., 2012), on the selective AD-like neurodegenerative phenotype of the PS1M146L/A β PP751SweLondon model (data summarized in Table 3.1.1).

Table 3.1.1. Summary of the mayor neuropathological findings in the PS1M146L/APPSweLondon transgenic model

	Subiculum	Hippocampus (CA1) *	Entorhinal Cortex**
Intracellular Aβ	2 mo	2 mo	NT
Extracellular Aβ	2-3 mo	4 mo	4 mo
Dystrophic neurites	2-3 mo	4 mo	4 mo
Neuronal loss	4 mo (SOM+) 6 mo (pyramidal)	4 mo (CR+) 6 mo (SOM+) 18 mo (pyramidal)	6 mo (SOM+ and pyramidal)
Neuroinflammation	3-4 mo	4-6 mo (microglial M2 phenotype) 18 mo (microglial M1 phenotype)	6 mo (microglial M2 and M1 phenotypes)

The age (months, mo) when intracellular A β (immunoreactivity with the A β 42 or oligomer-specific OC antibodies), extracellular deposits (immunopositive for 6E10, A β 42 or OC antibodies, or stained with thioflavin-s or congo red), dystrophic neurites around plaques (immunopositive for A β PP, SYN, ubiquitin,

LC3 or phospho-tau AT8 antibodies), neuronal loss (measured by stereological analysis of SOM+, CR+ or pyramidal neurons), and neuroinflammation (microglial and astroglial activation) are detected is indicated. NT, non detected. SOM+, immunopositive somatostatin interneurons; CR+, immunopositive calretinin interneurons. * Data from references Ramos et al., 2006; Jimenez et al., 2008; and Baglietto-Vargas et al., 2010. ** Data from reference Moreno-Gonzalez et al., 2009.

We show here that the subiculum of this model is the earliest affected hippocampal region exhibiting a wide repertoire of AD-like pathological manifestations including 1) accelerated A β accumulation, both intra- and extracellularly; 2) prominent axonal neuritic pathology, that affects presynaptic terminals, with the accumulation of autophagy vesicles; 3) and most valuable, significant neuronal loss from principal and local inhibitory populations.

As we have reported previously, this PS1/APP transgenic model has the advantage over other models of showing significant loss of neurons in highly vulnerable brain areas (Ramos et al., 2006; Moreno-Gonzalez et al., 2009; Baglietto-Vargas et al., 2010) similar to AD patients. Loss of interneurons was an early event (4-6 months of age) in the hippocampal CA subfields and dentate gyrus, as well as in the entorhinal cortex, however principal neurons were differentially affected by age in these areas. While the entorhinal principal neurons showed early vulnerability (6 months of age) the hippocampus (CA1 subfield) displayed significant pyramidal cell decline only at old ages (>17 months of age). Few others transgenic models have also been reported to have neuronal death (Casas et al., 2004; Oakley et al., 2006; Cohen et al., 2013; Saul et al., 2013; Wright et al., 2013), however this was usually quantitatively minor and/or occurred at very late ages. Subicular neurodegeneration has been previously reported in the 5xFAD model at 9 months of age (Oakley et al., 2006; Eimer and Vassar, 2013). Nevertheless, in these studies no quantitative analysis was made to determine the extent of subicular cell loss and neither the vulnerable neuronal type was identified. Here we demonstrate by unbiased stereology a significant decline in SOM-containing interneurons (-27% and -69% at 4 and 6 months of age, respectively) and, most importantly, in principal subicular neurons (-28% at 6 months) of our PS1/APP model at early ages. Therefore, this is the first study showing a quantitative decline of subicular neurons, and noteworthy, occurring as early as 4-6 months of age. Together, and of relevance, subiculum is the first hippocampal brain region exhibiting principal neuronal loss in this model.

Among the potential causative agents for this neuronal loss, A β is the leading candidate in amyloidogenic models bearing familial mutations, as the PS1/APP model used in this study. In fact, A β pathology in the subiculum preceded the loss of neurons. Furthermore, we have also compared the severity of the amyloid pathology in the subiculum with other highly AD vulnerable brain areas, such as CA1 of hippocampus and entorhinal cortex. Interestingly, the subiculum displayed up to 5 and 7 fold increased A β load than CA1 and entorhinal cortex, respectively, at the age of 4 months. Therefore,

subiculum is the earliest and most severely affected region by the amyloid pathology. In consequence, we also observed an extensive neuronal (pyramidal and GABAergic) degeneration in this particular brain region.

Abundant intraneuronal accumulation of A β 42 was seen at 2 months of age mostly located in the endolysosomes and immediately after a rapid onset of amyloid plaques was manifested. As the plaque load increased with age the intracellular A β labeling was less evident. In fact, at 6 months of age it was really difficult to visualize A β -immunolabeled neuronal somata at light microscopy suggesting a possible transient localization of A β in the neuronal compartments (soma vs axonal/synaptic?). However, immunogold labeling demonstrated the presence of some intracellular A β within the cell bodies at least in 6-month-old PS1/APP mice. We cannot rule out the possibility that plaques bind most A β antibodies thus preventing the intracellular A β labeling. Our results are in agreement with others since A β pathology (intra preceding extra) was reported to be early present in the subiculum of other transgenic models (Oakley et al., 2006; Ronnback et al., 2011; Eimer and Vassar, 2013).

About which A β (intra or extra) contributes mainly to the neuronal death in this region, our data point to the extracellular pool as the most likely toxic agent. Interneurons do not express the human mutant A β PP transgene in our PS1/APP model (see Fig. 6), therefore these cells do not produce and accumulate A β , ruling out the possibility of the intraneuronal source as the causative agent for the death in the SOM-population. On the other hand, principal subicular neurons contain intracellular A β since very early ages (2 months or even before), and though the present results do not allow us to completely discard the toxic role of this intracellular stock, the loss of this population (aprox. 30%) is delayed until the age of 6 months. Thus, it is most likely to be associated to the accelerated extracellular A β accumulation. This asseveration was also based on: 1) early (2 months) intracellular A β accumulation is seen in CA1 principal neurons of our model (see Fig. 4 A,D) however no neuronal loss in the CA1 pyramidal layer is detected until 17-18 months of age (Schmitz et al., 2004; Jimenez et al., 2008); 2) principal cell loss in the entorhinal cortex is also an early event (6 months) in this model, however it is associated to extracellular rather than intracellular A β pathology (Moreno-Gonzalez et al., 2009). In fact, the vulnerable principal neurons in the entorhinal cortex were those located in the highly A β loaded deep layers (V-VI) and interestingly, these cells did not even expressed the human A β PP transgene and therefore did not accumulate A β intracellularly; 3) early intracellular A β has been detected in many other animal models, however neuronal loss is usually absent or occurred at late ages (Schaeffer et al., 2011; Kitazawa et al., 2012; LaFerla and Green, 2012; Platt et al., 2013); 4) A β plaques are a potent source of neurotoxic damage as many axonal dystrophies developed in their close periphery (neuritic

plaques); 5) A β plaques induce a strong glial activation in subiculum (data not shown) as seen in hippocampus and entorhinal cortex (Jimenez et al., 2008; Moreno-Gonzalez et al., 2009). A cytotoxic profile of this inflammatory response was temporally associated with the pyramidal neuronal death in these brain regions.

Therefore, cerebral amyloidosis (extracellular) seems to be the driving force for neuronal loss and the axonal/synaptic damage in the subiculum as well as in other brain areas (Ramos et al., 2006; Moreno-Gonzalez et al., 2009; Baglietto-Vargas et al., 2010; Jimenez et al., 2011; Sanchez-Varo et al., 2012; Torres et al., 2012). Amyloid plaques are potentially major sources of soluble and toxic oligomeric A β (Martins et al., 2008). Then, the accelerated and severe formation of plaques in subiculum, compared to other brain regions, could locally increase the concentration of these oligomers since early ages affecting the most vulnerable neuronal populations.

Subicular A β deposits were surrounded by hyperphosphorylated tau-positive axonal dystrophies and A β oligomers have been shown to induce an increase in tau hyperphosphorylation (DeFelice et al., 2008; Jin et al., 2011) as well as axonal transport failure with organelle accumulation through GSK3-beta signalling (Lee et al., 2011; Torres et al., 2012). In support of this idea, we have recently demonstrated the involvement of A β oligomers in the activation of GSK3-beta and tau phosphorylation (Jimenez et al., 2011). Together, A β oligomers released from plaques might cause locally the interruption of axonal transport leading to a severe accumulation of vesicles mostly from autophagy pathway (LC3-positive) due to failed lysosome maturation (Sanchez-Varo et al., 2012; Torres et al., 2012; present work) and in consequence the formation of axonal dystrophies. These dystrophies are positive for synaptic proteins (synaptophysin or VGluT1) as shown by confocal microscopy which might reflect synaptic protein accumulation due to axonal transport deficiency. Alternatively, some (or most) dystrophies might be actually presynaptic boutons directly affected by the plaque-associated toxic A β oligomers. In agreement with the last suggestion, we have demonstrated by EM the presence of dystrophic synaptic terminals making contact with normal postsynaptic elements near plaques in subiculum as we have previously shown also in CA1 (Sanchez-Varo et al., 2012). These morphologically altered synaptic terminals might represent the initial step of axonal degeneration previous to the synapse loss, the major correlate for cognitive deficits in the initial stages of the disease (Davies et al., 1987; Terry et al., 1991; Masliah et al., 2001; Scheff et al., 2006). In addition, axonal/synaptic damage could trigger a neurodegenerative process toward the cell bodies. In line with this, we and others have reported a relationship between extracellular A β accumulation in axonal fields and the progressive degeneration of their away located projecting neurons in AD models (Baglietto-Vargas et al., 2010; Liu et al., 2008). This suggestion is also supported by the apparent resistance of the PV positive GABAergic cells. As shown in this and previous

work, the number of subicular, hippocampal and entorhinal PV positive cells was not modified in the PS1/APP model. These data are in line with the relative resistance of these cells observed in AD patients (Iwamoto and Emson, 1991; Takahashi et al., 2010). Furthermore, at the age tested, the PV positive cells developed few (if any) dystrophic neurites even in close proximity to the A β plaques (see Fig. 2B2). At present, we do not know the mechanisms that determine the relative protection of this neuronal subpopulation to the A β pathology. However, it is possible that the high expression of a Ca²⁺-chelating protein, such as PV, could protect the cell from the extracellular A β damage.

All together, our data support A β plaques as major contributors of neuronal/axonal damage in this AD model. The relevance of this conclusion for the disease in humans could be of controversial since no clear association has been made so far between the extent of amyloid burden and dementia severity in AD patients. Moreover, A β deposition begins over a decade prior to the dementia and asymptomatic cortical A β deposition in elderly individuals is also well documented (Price and Morris, 1999; Bennet, 2006; Perrin et al., 2009; Negash et al., 2011; Kantarci, 2014). However, a recent report (Perez-Nievas et al., 2013) has shed light on this intriguing topic and discriminate demented and non-demented individuals with high amyloid burden on the basis of their neuropathological phenotype. Authors identified that plaques in demented cases had significant higher amount of oligomeric A β and, importantly, a higher number of dystrophic neurites compared to non-demented individuals. In addition, accumulation of phospho-tau into synaptic compartments, and stronger glial activation response discriminated demented from non-demented cases. These findings highlight the existence of different plaques, in relation to their toxicity, that might account for the onset and severity of dementia during disease progression. Therefore, the characterization of plaques on the basis of their capacity to induce axonal and neuronal damage is crucial to validate animal models for research and drug testing. In this sense, our PS1/APP model is of great interest since these mice develop human-like neuritic plaques whose toxicity can be modulated *in vivo*, as we have recently shown, by lithium administration resulting in a marked reduction of neuronal and axonal damage and cognitive improvement (Trujillo-Estrada et al., 2013).

The subiculum is the main hippocampal output, and therefore hippocampal–cortical and hippocampal–subcortical communication arises most predominantly from subicular neurons (O’Mara et al., 2001; O’Mara, 2005). In fact, this region is specifically involved in spatial memory and navigation, as well as in stress responses and limbic-mediated affective, cognitive and behavioural processes (O’Mara, 2006; O’Mara et al., 2009). Subiculum may act as a possible interface between the hippocampus and the neocortex during the consolidation of memories (Craig and Commins, 2006). Interestingly, a relationship between cortical thinning in the subicular and entorhinal regions with the decline in the ability to encode new memories over time has been reported in mild

cognitive impairment patients (Burggren et al., 2011). Then, the early reduction in the subicular neurons along with the axonal/synaptic damage might contribute to the altered neuronal network in the hippocampus and entorhinal cortex seen in AD.

CONCLUSION

The lack of significant neuronal loss in most AD models is, in fact, the major shortcoming for the preclinical evaluation of drugs that could have greater potential in patients to alleviate or prevent this disease. In this study, we have analyzed the histopathological events in the subiculum of PS1/APP mice, which is the earliest affected region in this model with neuronal vulnerability at early ages. In addition, our data demonstrate the existence of an early subicular axonal and synaptic pathology. These neurodegenerative processes occur in parallel, and closely related, with the onset an accelerated progression of the extracellular amyloid- β deposition, thus suggesting plaques as major contributors of neuronal/axonal damage. Data reported here indicate that this AD model displays a selective AD-like neurodegenerative phenotype in highly vulnerable regions, including the subiculum, and therefore can be a very useful model for testing the therapeutic ability of potential compounds to protect neurons and ameliorate disease symptoms.

REFERENCES

- Amaral DG, Witter MP.** (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31:571-591.
- Apostolova LG, Dutton RA, Dinov ID, Hayashi KM, Toga AW, Cummings JL, Thompson PM.** (2006). Conversion of mild cognitive impairment to Alzheimer disease predicted by hippocampal atrophy maps. *Arch Neurol.*, 63:693-699.
- Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuete M, Vitorica J, Gutierrez A.** (2010). Calretinin interneurons are early targets of extracellular amyloid-beta pathology in PS1/AbetaPP Alzheimer mice hippocampus. *J Alzheimers Dis.*, 21:119-132.
- Ball MJ.** (1977). Neuronal loss, neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in the hippocampus with ageing and dementia. A quantitative study. *Acta Neuropathol.*, 37:111-118.
- Bennett DA.** (2006). Postmortem indices linking risk factors to cognition: results from the Religious Order Study and the Memory and Aging Project. *Alzheimer Dis Assoc Disord.*, 20:S63-S68.
- Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, Planche M, Canton T, Jedidi I, Gohin M, Wirths O, Bayer TA, Langui D, Duyckaerts C, Tremp G, Pradier L.** (2003). Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with Abeta deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp Neurol.*, 184:247-263.
- Bobinski M, Wegiel J, Wisniewski HM, Tarnawski M, Bobinski M, Reisberg B, de Leon MJ, Miller DC.** (1996). Neurofibrillary pathology--correlation with hippocampal formation atrophy in Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*, 17:909-919.
- Bobinski M, Wegiel J, Tarnawski M, Bobinski M, Reisberg B, de Leon MJ, Miller DC, Wisniewski HM.** (1997). Relationships between regional neuronal loss and neurofibrillary changes in the hippocampal formation and duration and severity of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 56: 414-420.
- Burggren AC, Renner B, Jones M, Donix M, Suthana NA, Martin-Harris L, Ercoli LM, Miller KJ, Siddarth P, Small GW, Bookheimer SY.** (2011). Thickness in entorhinal and subicular cortex predicts episodic memory decline in mild cognitive impairment. *Int J Alzheimers Dis.*, 2011:956053.

- Casas C, Sergeant N, Itier JM, Blanchard V, Wirths O, van der KN, Vingtdoux V, van de SE, Ret G, Canton T, Drobecq H, Clark A, Bonici B, Delacourte A, Benavides J, Schmitz C, Tremp G, Bayer TA, Benoit P, Pradier L. (2004). Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *Am J Pathol.*, 165:1289-1300.
- Cohen RM, Rezai-Zadeh K, Weitz TM, Rentsendorj A, Gate D, Spivak I, Bholat Y, Vasilevko V, Glabe CG, Breunig JJ, Rakic P, Davtyan H, Agadjanyan MG, Kepe V, Barrio JR, Bannykh S, Szekely CA, Pechnick RN, Town T. (2013). A transgenic Alzheimer rat with plaques, tau pathology, behavioral impairment, oligomeric abeta, and frank neuronal loss. *J Neurosci.*, 33:6245-6256.
- Craig S, Commins S. (2006). The subiculum to entorhinal cortex projection is capable of sustaining both short- and long-term plastic changes. *Behav Brain Res.*, 174:281-288.
- Davies CA, Mann DM, Sumpter PQ, Yates PO. (1987). A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.*, 78:151-164.
- Davies DC, Wilmott AC, Mann DM. (1988). Senile plaques are concentrated in the subicular region of the hippocampal formation in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.*, 94:228-233.
- Davies DC, Horwood N, Isaacs SL, Mann DM. (1992). The effect of age and Alzheimer's disease on pyramidal neuron density in the individual fields of the hippocampal formation. *Acta Neuropathol.*, 83:510-517.
- Decker H, Lo KY, Unger SM, Ferreira ST, Silverman MA. (2010). Amyloid-beta peptide oligomers disrupt axonal transport through an NMDA receptor-dependent mechanism that is mediated by glycogen synthase kinase 3beta in primary cultured hippocampal neurons. *J Neurosci.*, 30:9166-9171.
- De Felice FG, Wu D, Lambert MP, Fernandez SJ, Velasco PT, Lacor PN, Bigio EH, Jerecic J, Acton PJ, Shughrue PJ, Chen-Dodson E, Kinney GG, Klein WL. (2008). Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers. *Neurobiol Aging*, 29:1334-1347.
- Ding SL. (2013). Comparative anatomy of the prosubiculum, subiculum, presubiculum, postsubiculum, and parasubiculum in human, monkey, and rodent. *J Comp Neurol.*, 521:4145-4162.
- Eimer WA, Vassar R. (2013). Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease correlates with intraneuronal Abeta42 accumulation and Caspase-3 activation. *Mol Neurodegener.*, 8:2.
- Falke E, Nissanov J, Mitchell TW, Bennett DA, Trojanowski JQ, Arnold SE. (2003). Subicular dendritic arborization in Alzheimer's disease correlates with neurofibrillary tangle density. *Am J Pathol.*, 163:1615-1621.
- Franklin KBJ, Paxinos G. (2008). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, Academic Press.
- Franko E, Joly O. (2013). Evaluating Alzheimer's disease progression using rate of regional hippocampal atrophy. *PLoS One*, 8:e71354.
- Gomez-Isla T, Price JL, McKeel DW Jr, Morris JC, Growdon JH, Hyman BT. (1996). Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci.*, 16:4491-4500.
- Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B. (1988). The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*, 96:857-881.
- Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR, Barnes CL. (1984). Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science*, 225:1168-1170.
- Iwamoto N, Emson PC. (1991). Demonstration of neurofibrillary tangles in parvalbumin-immunoreactive interneurons in the cerebral cortex of Alzheimer-type dementia brain. *Neurosci Lett.*, 128:81-84.
- Jimenez S, Baglietto-Vargas D, Caballero C, Moreno-Gonzalez I, Torres M, Sanchez-Varo R, Ruano D, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J. (2008). Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *J Neurosci.*, 28:11650-11661.
- Jimenez S, Torres M, Vizuete M, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Trujillo-Estrada L, Carmona-Cuenca I, Caballero C, Ruano D, Gutierrez A, Vitorica J. (2011). Age-dependent accumulation of soluble amyloid beta (Abeta) oligomers reverses the neuroprotective effect of soluble amyloid precursor protein-alpha (sAPP(alpha)) by modulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-GSK-3beta pathway in Alzheimer mouse model. *J Biol Chem.*, 286:18414-18425.
- Jin M, Shepardson N, Yang T, Chen G, Walsh D, Selkoe DJ. (2011). Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108:5819-5824.
- Kantarci K. (2014). Molecular Imaging of Alzheimer Disease Pathology. *AJNR Am J Neuroradiol.*

- Killiany RJ, Hyman BT, Gomez-Isla T, Moss MB, Kikinis R, Jolesz F, Tanzi R, Jones K, Albert MS.** (2002). MRI measures of entorhinal cortex vs hippocampus in preclinical AD. *Neurology*, 58:1188-1196.
- Kitazawa M, Medeiros R, Laferla FM.** (2012). Transgenic mouse models of Alzheimer disease: developing a better model as a tool for therapeutic interventions. *Curr Pharm Des.*, 18:1131-1147.
- Kril JJ, Patel S, Harding AJ, Halliday GM.** (2002). Neuron loss from the hippocampus of Alzheimer's disease exceeds extracellular neurofibrillary tangle formation. *Acta Neuropathol.*, 103:370-376.
- La JR, Perrotin A, de LS, V, Egret S, Doeuvre L, Belliard S, Eustache F, Desgranges B, Chetelat G.** (2013). Hippocampal subfield volumetry in mild cognitive impairment, Alzheimer's disease and semantic dementia. *Neuroimage Clin.*, 3:155-162.
- Laferla FM, Green KN.** (2012). Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, 2.
- Lee S, Sato Y, Nixon RA.** (2011). Primary lysosomal dysfunction causes cargo-specific deficits of axonal transport leading to Alzheimer-like neuritic dystrophy. *Autophagy*, 7:1562-1563.
- Liu Y, Yoo MJ, Savonenko A, Stirling W, Price DL, Borchelt DR, Mamounas L, Lyons WE, Blue ME, Lee MK.** (2008). Amyloid pathology is associated with progressive monoaminergic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.*, 28:13805-13814.
- Martins IC, Kuperstein I, Wilkinson H, Maes E, Vanbrabant M, Jonckheere W, Van GP, Hartmann D, D'Hooge R, De SB, Schymkowitz J, Rousseau F.** (2008). Lipids revert inert A β amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice. *EMBO J.*, 27:224-233.
- Maslah E, Mallory M, Alford M, DeTeresa R, Hansen LA, McKeel DW, Jr., Morris JC.** (2001). Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology*, 56:127-129.
- Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Del Rio JC, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuete M, Vitorica J, Gutierrez A.** (2009). Extracellular amyloid-beta and cytotoxic glial activation induce significant entorhinal neuron loss in young PS1(M146L)/APP(751SL) mice. *J Alzheimers Dis.*, 18:755-776.
- Negash S, Bennett DA, Wilson RS, Schneider JA, Arnold SE.** (2011). Cognition and neuropathology in aging: multidimensional perspectives from the Rush Religious Orders Study and Rush Memory And Aging Project. *Curr Alzheimer Res.*, 8:336-340.
- Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, Cuervo AM.** (2005). Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 64:113-122.
- Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoff J, Van EL, Berry R, Vassar R.** (2006). Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci.*, 26:10129-10140.
- O'Mara SM, Commins S, Anderson M, Gigg J.** (2001). The subiculum: a review of form, physiology and function. *Prog Neurobiol.*, 64:129-155.
- O'Mara S.** (2005). The subiculum: what it does, what it might do, and what neuroanatomy has yet to tell us. *J Anat.*, 207:271-282.
- O'Mara S.** (2006). Controlling hippocampal output: the central role of subiculum in hippocampal information processing. *Behav Brain Res.*, 174:304-312.
- O'Mara SM, Sanchez-Vives MV, Brotons-Mas JR, O'Hare E.** (2009). Roles for the subiculum in spatial information processing, memory, motivation and the temporal control of behaviour. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 33:782-790.
- Pennanen C, Kivipelto M, Tuomainen S, Hartikainen P, Hanninen T, Laakso MP, Hallikainen M, Vanhanen M, Nissinen A, Helkala EL, Vainio P, Vanninen R, Partanen K, Soininen H.** (2004). Hippocampus and entorhinal cortex in mild cognitive impairment and early AD. *Neurobiol Aging*, 25:303-310.
- Perez-Nievas BG, Stein TD, Tai HC, Dols-Icardo O, Scotton TC, Barroeta-Espar I, Fernandez-Carballo L, de Munain EL, Perez J, Marquie M, Serrano-Pozo A, Frosch MP, Lowe V, Parisi JE, Petersen RC, Ikonomic MD, Lopez OL, Klunk W, Hyman BT, Gomez-Isla T.** (2013). Dissecting phenotypic traits linked to human resilience to Alzheimer's pathology. *Brain*, 136:2510-2526.
- Perrin RJ, Fagan AM, Holtzman DM.** (2009). Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease. *Nature*, 461:916-922.
- Price JL, Morris JC.** (1999). Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Ann Neurol.*, 45:358-368.
- Platt TL, Reeves VL, Murphy MP.** (2013). Transgenic models of Alzheimer's disease: better utilization of existing models through viral

- transgenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1832:1437-1448.
- Price JL, Ko AI, Wade MJ, Tsou SK, McKeel DW, Morris JC.** (2001). Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer disease. *Arch Neurol.*, 58:1395-1402.
- Ramos B, Baglietto-Vargas D, Del Rio JC, Moreno-Gonzalez I, Santa-Maria C, Jimenez S, Caballero C, Lopez-Tellez JF, Khan ZU, Ruano D, Gutierrez A, Vitorica J.** (2006). Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1xAPP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 27:1658-1672.
- Ronnback A, Zhu S, Dillner K, Aoki M, Lilius L, Naslund J, Winblad B, Graff C.** (2011). Progressive neuropathology and cognitive decline in a single Arctic APP transgenic mouse model. *Neurobiol Aging*, 32:280-292.
- Sanchez-Varo R, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, De C, V, Jimenez S, Ruano D, Vizuete M, Davila JC, Garcia-Verdugo JM, Jimenez AJ, Vitorica J, Gutierrez A.** (2012). Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer's mice hippocampus. *Acta Neuropathol.*, 123:53-70.
- Saul A, Sprenger F, Bayer TA, Wirths O.** (2013). Accelerated tau pathology with synaptic and neuronal loss in a novel triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 34:2564-2573.
- Schaeffer EL, Figueiro M, Gattaz WF.** (2011). Insights into Alzheimer disease pathogenesis from studies in transgenic animal models. *Clinics (Sao Paulo)*, 66 Suppl 1:45-54.
- Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, Mufson EJ.** (2006). Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging*, 27:1372-1384.
- Schmitz C, Rutten BP, Pielen A, Schafer S, Wirths O, Tremp G, Czech C, Blanchard V, Multhaup G, Rezaie P, Korr H, Steinbusch HW, Pradier L, Bayer TA.** (2004). Hippocampal neuron loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol.*, 164:1495-1502.
- Simic G, Kostovic I, Winblad B, Bogdanovic N.** (1997). Volume and number of neurons of the human hippocampal formation in normal aging and Alzheimer's disease. *J Comp Neurol.*, 379:482-494.
- Takahashi H, Brasnjevic I, Rutten BP, van der KN, Perl DP, Bouras C, Steinbusch HW, Schmitz C, Hof PR, Dickstein DL.** (2010). Hippocampal interneuron loss in an APP/PS1 double mutant mouse and in Alzheimer's disease. *Brain Struct Funct.*, 214:145-160.
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R.** (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol.*, 30:572-580.
- Torres M, Jimenez S, Sanchez-Varo R, Navarro V, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Carmona I, Davila JC, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J.** (2012). Defective lysosomal proteolysis and axonal transport are early pathogenic events that worsen with age leading to increased APP metabolism and synaptic Abeta in transgenic APP/PS1 hippocampus. *Mol Neurodegener.*, 7:59.
- Trujillo-Estrada L, Jimenez S, De C, V, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Navarro V, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Davila JC, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J.** (2013). In vivo modification of Abeta plaque toxicity as a novel neuroprotective lithium-mediated therapy for Alzheimer's disease pathology. *Acta Neuropathol Commun.*, 1:73.
- Van Hoesen GW, Hyman BT.** (1990). Hippocampal formation: anatomy and the patterns of pathology in Alzheimer's disease. *Prog Brain Res.*, 83:445-457.
- West MJ.** (1993). Regionally specific loss of neurons in the aging human hippocampus. *Neurobiol Aging*, 14:287-293.
- West MJ, Kawas CH, Martin LJ, Troncoso JC.** (2000). The CA1 region of the human hippocampus is a hot spot in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.*, 908:255-259.
- West MJ, Kawas CH, Stewart WF, Rudow GL, Troncoso JC.** (2004). Hippocampal neurons in pre-clinical Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 25:1205-1212.
- Wright AL, Zinn R, Hohensinn B, Konen LM, Beynon SB, Tan RP, Clark IA, Abdipranoto A, Vissel B.** (2013). Neuroinflammation and neuronal loss precede Abeta plaque deposition in the hAPP-J20 mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One*, 8:e59586.

3.2.

Degeneración de neuronas colinérgicas del teléncéfalo basal en modelos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer

INTRODUCCIÓN

Aunque la acumulación extracelular de A β y la formación intracelular de ovillos neurofibrilares son consideradas las dos lesiones histopatológicas principales de la enfermedad de Alzheimer (EA), la disfunción colinérgica es particularmente relevante porque sucede en estadios tempranos de la enfermedad (Querfurth y LaFerla, 2010; Craig y col., 2011). Hasta la fecha, las únicas terapias farmacológicas aprobadas para la EA (junto con los antagonistas de los receptores NMDA), aunque con moderados beneficios de carácter sintomático, se basan en el refuerzo de la señalización colinérgica (Hansen y col., 2008; ver Apdo. 1.3 de la Introducción General). Estudios clínicos y *post mortem* han mostrado la implicación de la transmisión colinérgica en el deterioro cognitivo y han apoyado la idea de que un déficit en los niveles de acetilcolina (ACh) puede ser responsable del inicio de la enfermedad (Coyle y col., 1983; Watanabe y col., 2013). La ACh, un neurotransmisor ampliamente distribuido en el sistema nervioso, está implicada en la actividad cortical, el control del flujo cerebral, la regulación del ciclo sueño-vigilia y la modulación de procesos de memoria y aprendizaje (Schliebs y Arendt, 2011).

En 1976, dos grupos de investigación mostraron que la EA estaba asociada con una pérdida severa de marcadores colinérgicos en la corteza cerebral (Bowen y col., 1976; Davies y Maloney, 1976). Así, se ha descrito una reducción de la inervación colinérgica en áreas cerebrales importantes para el procesamiento de la información, debido a la pérdida progresiva de células colinérgicas del telencéfalo basal (BF, del inglés *basal forebrain*).

Esto ha llevado a establecer la hipótesis colinérgica de la EA, que establece que las neuronas colinérgicas están severamente afectadas en el curso de la enfermedad y esta disfunción es responsable del declive cognitivo (Bartus, 2000; Schliebs y Arendt, 2011). Además, la concentración de ACh y la actividad de su enzima de síntesis colinacetyltransferasa (ChAT, del inglés *choline acetyltransferase*; Oda, 1999), están reducidas en el hipocampo de pacientes de Alzheimer (Perry y col., 1981). Estos cambios se han relacionado con el nivel de demencia (Bierer y col., 1995; Niewiadomska y col., 2011). Recientemente, el uso de la neuroimagen funcional, ha proporcionado nuevos datos que apoyan el papel del sistema colinérgico en los cambios cognitivos asociados a la demencia y el envejecimiento (Dumas y Newhouse, 2011).

El sistema colinérgico central está formado por neuronas colinérgicas del circuito local (interneuronas localizadas en el caudado-*putamen*, el núcleo *accumbens*, el tubérculo olfatorio, la corteza, etc.), neuronas del telencéfalo basal, el sistema colinérgico pontino (neuronas colinérgicas del área tegmental pedunculopontina y el núcleo tegmental laterodorsal), motoneuronas colinérgicas, neuronas colinérgicas de los nervios craneales, células colinérgicas del sistema nervioso simpático y parasimpático (Bigl y Arendt, 1991; Schliebs y Arendt, 2006). En el presente estudio nos vamos a centrar en el sistema colinérgico del BF y las interneuronas colinérgicas corticales.

De acuerdo a la clasificación de Mesulam y col. (1983), las neuronas colinérgicas del telencéfalo basal se clasifican en seis grupos. La nomenclatura Ch, descrita originalmente en mono, se basa en los patrones de conectividad de cada grupo de células. El núcleo Ch1 está formado por neuronas colinérgicas localizadas en el *septum* medial (SM); las neuronas ChAT de los núcleos vertical (vBDB) y horizontal (hBDB) de la banda diagonal de Broca, constituyen los núcleos Ch2 y Ch3, respectivamente; el núcleo Ch4 lo forman las células del núcleo basal de Meynert (NBM; núcleo *basalis magnocellularis* en ratón; Everitt y Robbins, 1997; de aquí en adelante nos referiremos a él por su nomenclatura en humanos), el núcleo preóptico magnocelular y la sustancia *innominata*; las células presentes en el caudado *putamen*, el núcleo *accumbens* y el núcleo tegmental pedunculopontino constituyen el grupo Ch5; el núcleo tegmental laterodorsal es el Ch6; etc.

Las neuronas colinérgicas del BF proyectan a diferentes estructuras encefálicas contribuyendo a aspectos como la modulación de la actividad cortical (Rasmusson, 2000), la atención, el aprendizaje y la memoria (Power y col., 2003; Sarter y col., 2003; Mesulam, 2004). Estas eferencias muestran una organización topográfica concreta, lo cual ha permitido distinguir tres vías principales de proyección (Fig. 3.2.1; Mesulam y col., 1983; Bigl y Arendt, 1991; Schafer y col., 1998; Semba, 2000).

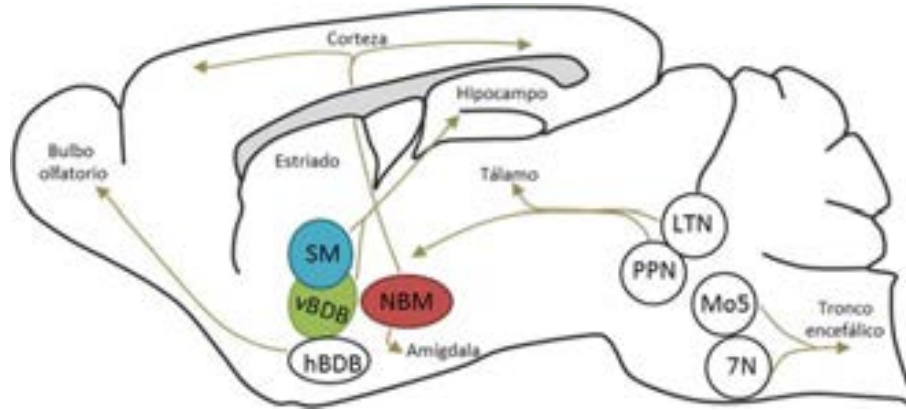


Figura 3.2.1. Principales vías de proyección del sistema colinérgico. La vía basal-hipocampal, se origina en el *septum* medial (SM; Ch1; resaltado en azul) y el núcleo vertical de la banda diagonal de Broca (vBDB; Ch2; en verde) y proyecta al hipocampo, penetrando a través del *fornix* (Niewiadomska y col., 2009). Esta vía muestra una degeneración progresiva en la EA (Whitehouse y col., 1982) y está implicada en la función cognitiva y en la modulación de la memoria espacial (de trabajo) a corto plazo. La vía basal-olfatoria se origina en el núcleo horizontal de la banda diagonal de Broca (hBDB; Ch3) y proyecta al bulbo olfatorio y núcleos asociados a éste. Las vías basal-cortical y basal-amigdalares se originan en el núcleo basal de Meynert (NBM; Ch4; en rojo) y la sustancia *innominata*, e inervan a la neocorteza y la amígdala. La vía basal-cortical contribuye a la función atencional visual, mientras que la basal-amigdalares está implicada en la retención del condicionamiento afectivo (Everitt y Robbins, 1997). Los núcleos pedunculopontino (PPN; Ch5) y tegmental laterodorsal (LTN; Ch6) del tronco encefálico proyectan al tálamo. Mo5 y 7N son núcleos colinérgicos motores que inervan el tronco encefálico (modificado de Mesulam y col., 1983; Lucas-Meunier, 2003).

A pesar de que estos núcleos son considerados colinérgicos, podemos encontrar otros tipos celulares como neuronas de proyección e interneuronas GABAérgicas, neuronas glutamatérgicas y neuropeptidérgicas (que incluyen somatostatina, neuropéptido Y o galanina) y neuronas productoras de proteínas ligadoras de calcio, como la parvalbúmina (Mufson y col., 2000a). Por otro lado, el BF recibe aferencias de una gran variedad de estructuras troncoencefálicas, diencefálicas y límbicas, así como de la propia neocorteza (Sarter y Bruno, 2000).

Como ya se ha comentado en la Introducción General de esta Tesis Doctoral, se han generado diversos modelos transgénicos de la EA (ver Apdo. 1.2). La mayoría de los modelos que sobreexpresan los genes *APP* y/o *PS1* mutados muestran acumulación extracelular de A β y degeneración de fibras colinérgicas corticales e hipocampales (Wong y col., 1999; Jaffar y col., 2001; Boncristiano y col., 2002; Buttini y col., 2002; German y col., 2003; Bales y col., 2006) acompañada de déficits de memoria. Sin embargo, estos cambios no están asociados con una pérdida de neuronas colinérgicas en el telencéfalo basal (ver Tabla 3.2.1), como ocurre en pacientes de la enfermedad de Alzheimer.

Tabla 3.2.1. Resumen de los déficits colinérgicos descritos en diferentes modelos animales de la EA. En la tabla se muestra el tipo de modelo animal, la patología colinérgica descrita y la referencia bibliográfica. APP: Proteína precursora amiloide; PS1: Presenilina 1; APP_L: APP con la mutación londinense (V717I); KI: *knock-in*; ChAT: colinacetyltransferasa; BF: telencéfalo basal; NBM: núcleo basal de Meynert; AChE: acetilcolinesterasa; SM: *septum* medial; vBDB: núcleo vertical de la banda diagonal de Broca; Mo5 y 7N: núcleos colinérgicos motores.

MODELO ANIMAL		PATOLOGÍA COLINÉRGICA	REFERENCIA
APP	Tg2576	Degeneración de fibras ChAT. Sin cambios en actividad enzimática ni en el número celular.	Apelt y col., 2002 Lüth y col., 2003
	APP23	Degeneración de fibras colinérgicas (reducción de su longitud; 24 meses). Disminución receptores corticales, actividad enzimática ChAT y volumen celular. Sin pérdida neuronal en el BF. Resultados contradictorios en cuanto al número celular: sin cambios, ligera pérdida y marcada pérdida neuronal en el SM (12-14 meses).	Boncristiano y col., 2002 Diez y col., 2003 Choi y col., 2013
	APP _L	Sin cambios en el número de células ChAT.	Bronfman y col., 2000
	PDAPP	Reducción de la densidad (aprox. 50%) de terminales colinérgicos en corteza (4 meses). Sin cambios en el número y/o tamaño celular, ni siquiera a los 2 años de edad.	German y col., 2003
	TgCRND8	Reducción significativa (-30%) del área de las células ChAT y del número de células en el NBM (-39%; 7 meses).	Bellucci y col., 2006
PS1	PS1 _{M146L}	Sin cambios en el tamaño o densidad de sinapsis colinérgicas (8 meses).	Wong y col., 1999
	PS1 _{A346E}	Reducción de la actividad enzimática de AChE.	Silveyra y col., 2008
TAU	Thy-Tau22	Alteración en la ruta de transporte septohipocampal asociada con una reducción del número de células ChAT (-28%) en el SM.	Belarbi y col., 2011
PS1/APP	APP _{SWE} / PS1 _{M146L}	Disminución en la densidad de sinapsis colinérgicas, sin cambio en el tamaño celular a los 8 meses de edad.	Wong y col., 1999
	PS1d9/APP	Neuritas distróficas ChAT (2-3 meses) en corteza e hipocampo. Reducción de la actividad enzimática ChAT. Sin cambios en el número celular medido mediante densidad óptica (excepto en la corteza motora).	Perez y col., 2007
	APP/PS1 _{KI}	Expresión del transgén APP en neuronas ChAT del núcleo motor, acompañada de la acumulación de Aβ intracelular. Disminución de células ChAT en los núcleos motores Mo5 (-27%; 6 meses) y 7N (-19%; 12 meses). Distrofias ChAT a partir de los 2 meses.	Christensen y col., 2010
	5xFAD	Reducción significativa de neuronas ChAT en el SM/vBDB (-23%; 6 meses).	Devi y Ohno, 2010
PS1/APP/ TAU	3xTg-AD	Disminución de células ChAT en el SM/vBDB (-23%; 18-20 meses) y NBM. Distrofias colinérgicas. Reducción de fibras colinérgicas en corteza e hipocampo. Pérdida actividad ChAT en el hipocampo (13-15 meses).	Perez y col., 2011; Orta-Salazar y col., 2014
Envejecimiento	Ratas viejas	Pérdida neuronal ChAT (-22,9%) en el BF a los 24-33 meses de edad.	De LaCalle y col., 1996; Baskerville y col., 2006

Debido a que la progresión de la degeneración colinérgica en nuestro modelo PS1/APP no ha sido caracterizada previamente (un aspecto esencial a comprender en un modelo para que sea posible su uso en la evaluación de aproximaciones terapéuticas), aquí hemos llevado a cabo una descripción sistemática de la evolución del sistema colinérgico durante la progresión de la enfermedad en este modelo.

RESULTADOS

3.2.1. Pérdida de neuronas colinérgicas en el telencéfalo basal de animales transgénicos de la enfermedad de Alzheimer

Para profundizar en la caracterización neuropatológica del modelo PS1/APP, con el que nuestro grupo de investigación lleva trabajando varios años (Ramos y col., 2006; Jimenez y col., 2008; Moreno-Gonzalez y col., 2009; Baglietto-Vargas y col., 2010; Sanchez-Varo y col., 2012; Torres y col., 2012; Trujillo-Estrada y col., 2014), y dada la implicación de las células colinérgicas en la EA, decidimos analizar esta población en los principales núcleos colinérgicos del telencéfalo basal en éste y otros modelos transgénicos de la enfermedad. Como ya hemos comentado, los principales núcleos colinérgicos que proyectan a hipocampo y corteza, respectivamente, son el núcleo vertical de la banda diagonal de Broca, el *septum* medial y el núcleo basal de Meynert.

En la Fig. 3.2.2 se muestra el núcleo vertical de la banda diagonal de Broca (vBDB) a los 4 y 12 meses de edad tanto en animales WT (Fig. 3.2.2A) como en el modelo doble transgénico PS1/APP (Fig. 3.2.2B), así como en otros modelos de la EA como son los parentales de nuestro modelo PS1/APP, los animales simple transgénicos APP (Fig. 3.2.2C) y PS1 (Fig. 3.2.2D), y otro modelo doble transgénico, el PS1d9/APP (Fig. 3.2.2E). Para poner de manifiesto las células colinérgicas del vBDB (y de los otros núcleos colinérgicos que se mostrarán a continuación) se ha realizado una tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo para la colinacetyltransferasa (ChAT), enzima de síntesis del neurotransmisor acetilcolina y marcador específico de las neuronas colinérgicas en el sistema nervioso (Mesulam y col., 1983). La inmunorreactividad para ChAT no solo se muestra en el soma, sino también en las dendritas proximales y distales, los axones y los terminales (Niewiadomska y col., 2009; imágenes de detalle G-J en Fig. 3.2.2).

A los 4 meses de edad, no se observan diferencias en cuanto a la morfología y número de neuronas colinérgicas entre los diferentes genotipos analizados. Sin embargo, podemos observar una aparente reducción en el número de células colinérgicas a los 12 meses en los animales PS1/APP en relación con los WT, así como en los PS1 y PS1d9/APP, mientras que en los APP no se observan cambios.

Morfológicamente, las neuronas colinérgicas (ver fotos Fig. 3.2.2G-J) se caracterizan por ser unas células de gran tamaño (18-43 μm), con largos axones y extensos árboles dendríticos, multipolares y con somas habitualmente ovalados o fusiformes (Semba, 2000). De hecho, las neuronas colinérgicas del cerebro de mamíferos están entre las más grandes y complejas descritas hasta la fecha, a juzgar por la longitud total de sus axones y ramificaciones (Wu y col., 2014). Aquí podemos observar una aparente reducción en el volumen celular de las células colinérgicas en el modelo PS1/APP (Fig. 3.2.2I-J), en comparación con los WT (Fig. 3.2.2G-H) a los 12 meses de edad. Esta reducción en el volumen de células ChAT ha sido descrita por otros autores (Mesulam y col., 2004) y está

acompañada por una reducida tinción para ChAT en el neuropilo, ambos signos cualitativos de cambios neurodegenerativos.

También en el *septum* medial (SM; Fig. 3.2.3), que contiene neuronas colinérgicas que proyectan al hipocampo y que se ha considerado como el marcapaso del ritmo theta de éste (Golebiewsky y col., 1999), se observa un menor número de células colinérgicas a los 12 meses de edad, en los animales PS1/APP (Fig. 3.2.3B2), así como en los PS1 (Fig. 3.2.3D2) y PS1d9/APP (Fig. 3.2.3E2), en comparación con los animales WT (Fig. 3.2.3A2) y APP (Fig. 3.2.3C2) de la misma edad. Esta reducción en el número celular se observa en las imágenes de detalle (Fig. 3.2.3G e I), donde además se puede apreciar una reducción en la densidad de fibras colinérgicas en los animales PS1/APP de 12 meses (Fig. 3.2.3I) en comparación con los WT (Fig. 3.2.3G).

El último núcleo colinérgico del telencéfalo basal analizado fue el núcleo basal de Meynert (NBM; Fig. 3.2.4), que representa el primer núcleo subcortical en degenerar en la EA (Davies y Maloney, 1976; Whitehouse y col., 1982). En este núcleo, las neuronas colinérgicas son grandes, poligonales y multipolares y forman una red dendrítica intranuclear característica (Bigl y Arendt, 1991; ver imagen detalle en Fig. 3.2.4G). Este núcleo degenera en los pacientes de la EA (en los pacientes con MCI, del inglés *mild cognitive impairment*, se ha observado una reducción significativa del volumen de este núcleo; Grothe y col., 2010).

Como se observa en las imágenes obtenidas mediante microscopía de campo claro, del mismo modo a lo descrito en los dos núcleos anteriores, se observa una reducción en esta población celular inmunorreactiva para ChAT en los animales PS1/APP (Fig. 3.2.4B2) con respecto a los WT (Fig. 3.2.4A2) a los 12 meses de edad. Esta reducción también se observó en los modelos PS1 (Fig. 3.2.4D2) y PS1d9/APP (Fig. 3.2.4E2), mientras que los animales APP (Fig. 3.2.4C) no mostraban diferencia aparente en el número celular con los WT (Fig. 3.2.4A) a ninguna de las edades analizadas.

La cuantificación estereológica de la población de neuronas ChAT-positivas en el núcleo vertical de la banda diagonal de Broca (Fig. 3.2.5A), expresada como densidad numérica (DN) en células/mm³ (tamaño del *frame*: 926,39 μm²; 40% de área escaneada), mostró una disminución significativa a los 12 meses de edad en los animales PS1/APP (-24,10±9,15%) en relación con los WT de la misma edad. En el resto de modelos transgénicos analizados, se corroboró también lo observado en las imágenes de la Fig. 3.2.2, esto es una reducción en la DN para ChAT en los animales PS1 (-33,36±9,69%) y en los PS1d9/APP (-23,16±6,66%), también a los 12 meses de edad. No se observaron diferencias entre animales WT y los transgénicos APP a ninguna de las edades analizadas (n=4, 3 secciones/animal; ADEVA de 1 vía, *post-hoc* de Tukey, *p<0,05).

Del mismo modo, en el *septum* medial (Fig. 3.2.5B), la cuantificación de las células colinérgicas (tamaño del *frame*: 926,39 μm²; 40% de área escaneada), corroboró una pérdida de esta población en los animales PS1/APP (-20,97±0,40%), PS1 (-18,44±6,27%)

Núcleo vertical de la banda diagonal de Broca (vBDB)

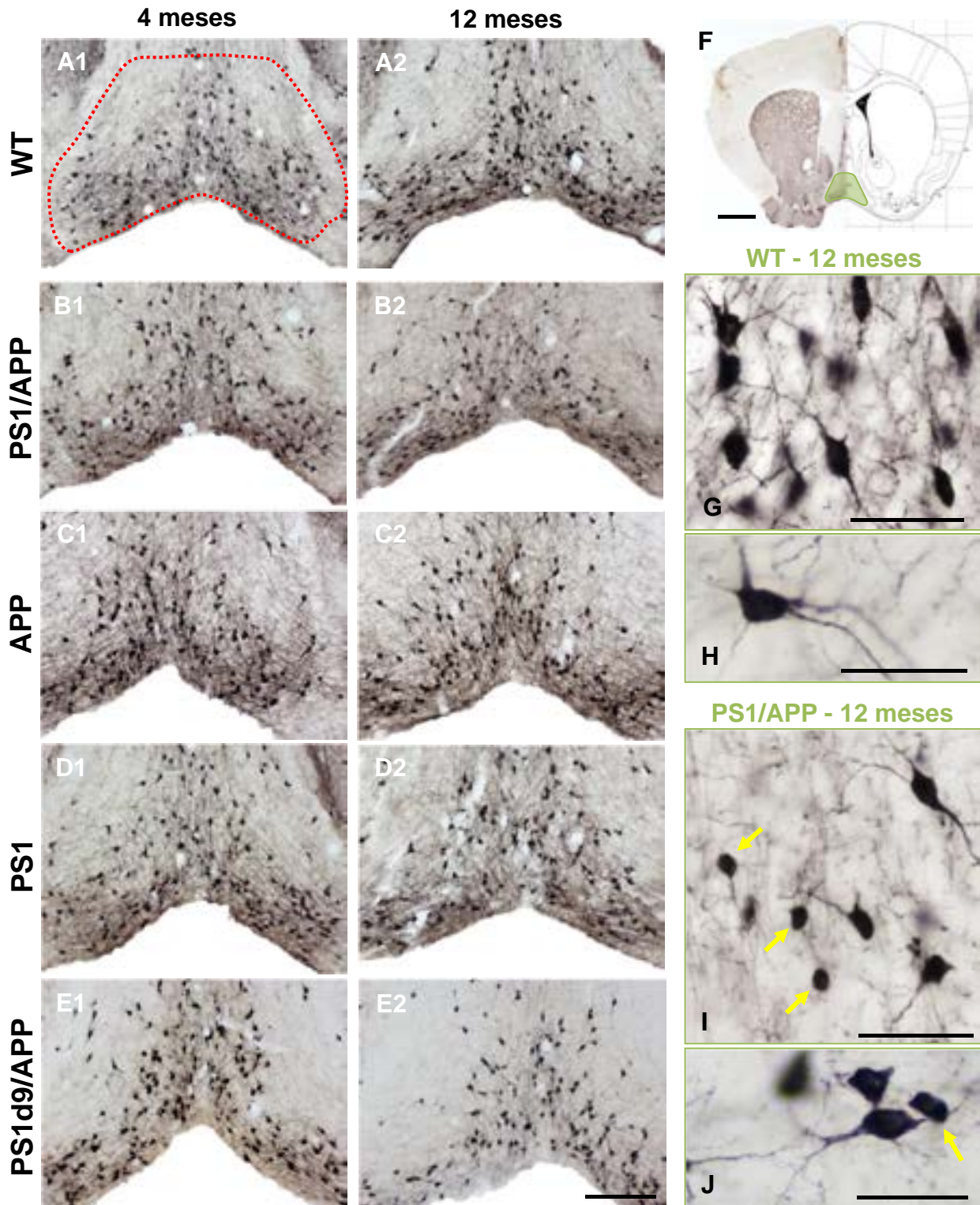


Figura 3.2.2. Neuronas ChAT-positivas en el vBDB. Este núcleo del telencéfalo basal (ver localización en F) contiene neuronas colinérgicas que proyectan al hipocampo (para detalles, ver G-I). A-E Imágenes de microscopía de campo claro que muestra la inmunorreactividad para ChAT de animales WT (A), PS1/APP (B), APP (C), PS1 (D) y PS1d9/APP (E) de 4 y 12 meses de edad. El número de células ChAT-positivas es menor en los animales PS1, PS1/APP y PS1d9/APP en comparación con los WT y APP a los 12 meses. En los animales PS1/APP se observan algunas células ChAT de menor tamaño a las presentes en los WT, que podría indicar una reducción en el volumen celular (flechas amarillas en I-J). Barras de escala: A-E: 200 μ m; F: 1000 μ m; G-J: 50 μ m.

Septum medial (SM)

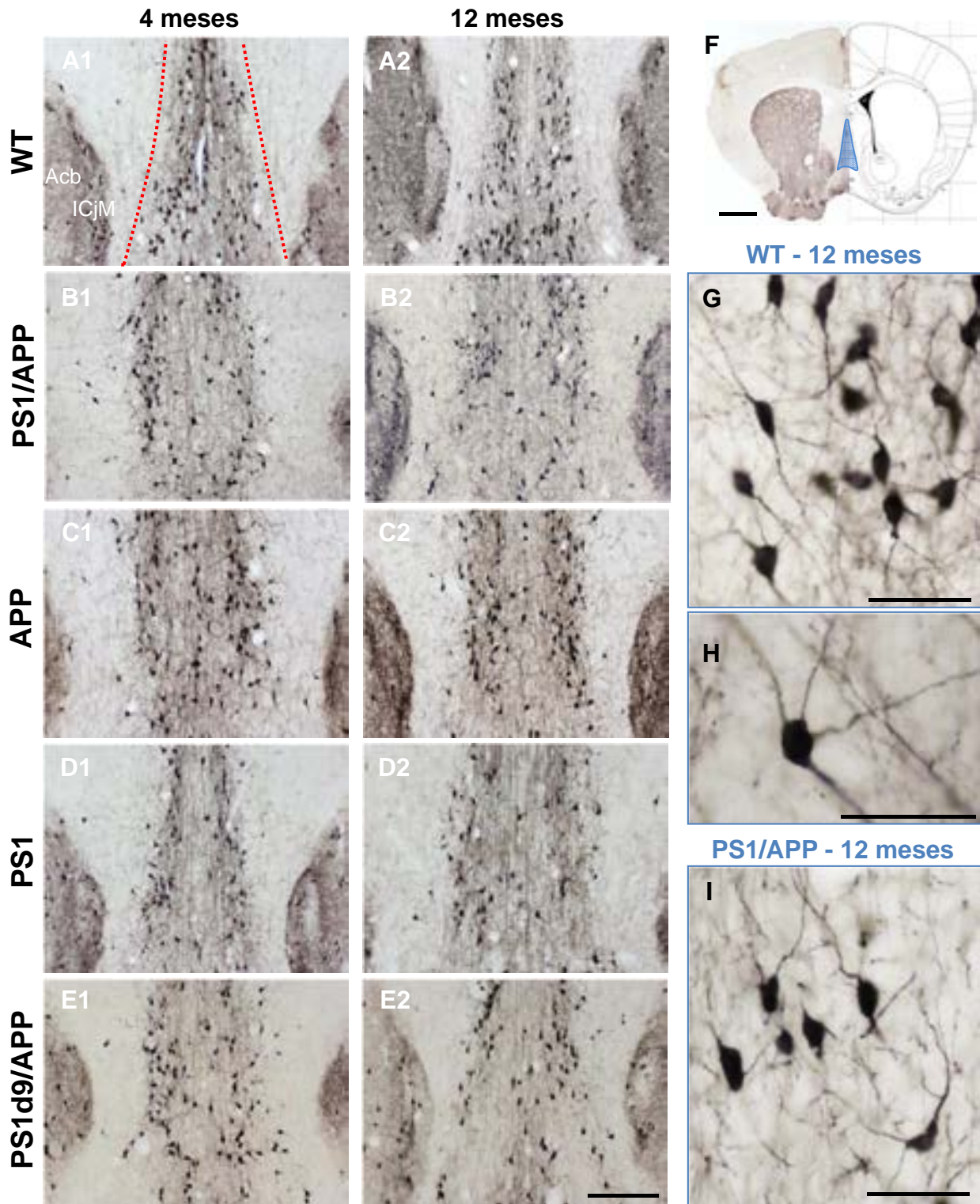


Figura 3.2.3. Inmunorreactividad para ChAT en el *septum* medial (SM). Este núcleo del telencéfalo basal (ver localización en F) contiene neuronas colinérgicas que proyectan al hipocampo. A-E) Imágenes de microscopía de campo claro de neuronas ChAT de animales WT (A), PS1/APP (B), APP (C), PS1 (D), PS1d9/APP (E) de 4 y 12 meses de edad. Se aprecia una reducción en el número de células colinérgicas en los animales transgénicos PS1, PS1/APP y PS1d9/APP de 12 meses, en comparación con los WT y APP de la misma edad. Para detalles de las células colinérgicas del SM ver G-I. Barra de escala: A-E, 200 μ m; F: 1000 μ m; G-I, 50 μ m. Acb: núcleo *accumbens*; ICjM: Islas de Calleja (del inglés *Major island of Calleja*).

Núcleo basal de Meynert (NBM)

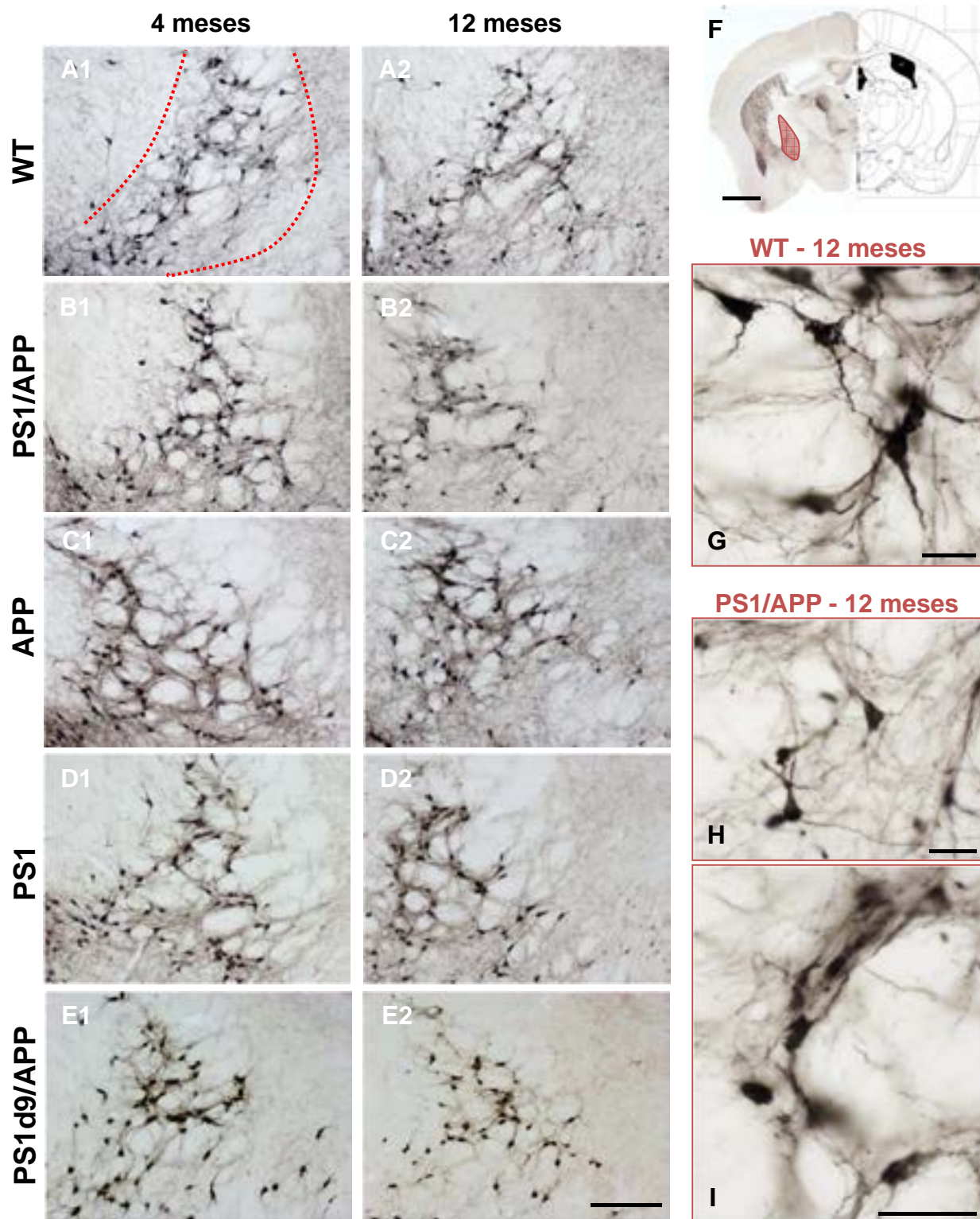


Figura 3.2.4. Neuronas ChAT-positivas en el núcleo basal de Meynert (NBM). Este núcleo constituye la principal proyección colinérgica a áreas corticales. A-E) Imágenes de microscopía de campo claro que muestran la inmunorreactividad para ChAT en animales WT (A), PS1/APP (B), APP (C), PS1 (D) y PS1d9/APP (E) de 4 y 12 meses. El número de células colinérgicas (detalles en G-I) está reducido en los animales PS1, PS1/APP y PS1d9/APP de 12 meses, en comparación con los WT y APP de la misma edad. Barra de escala: A-E, 200 μm ; F, 1000 μm ; G-I, 50 μm .

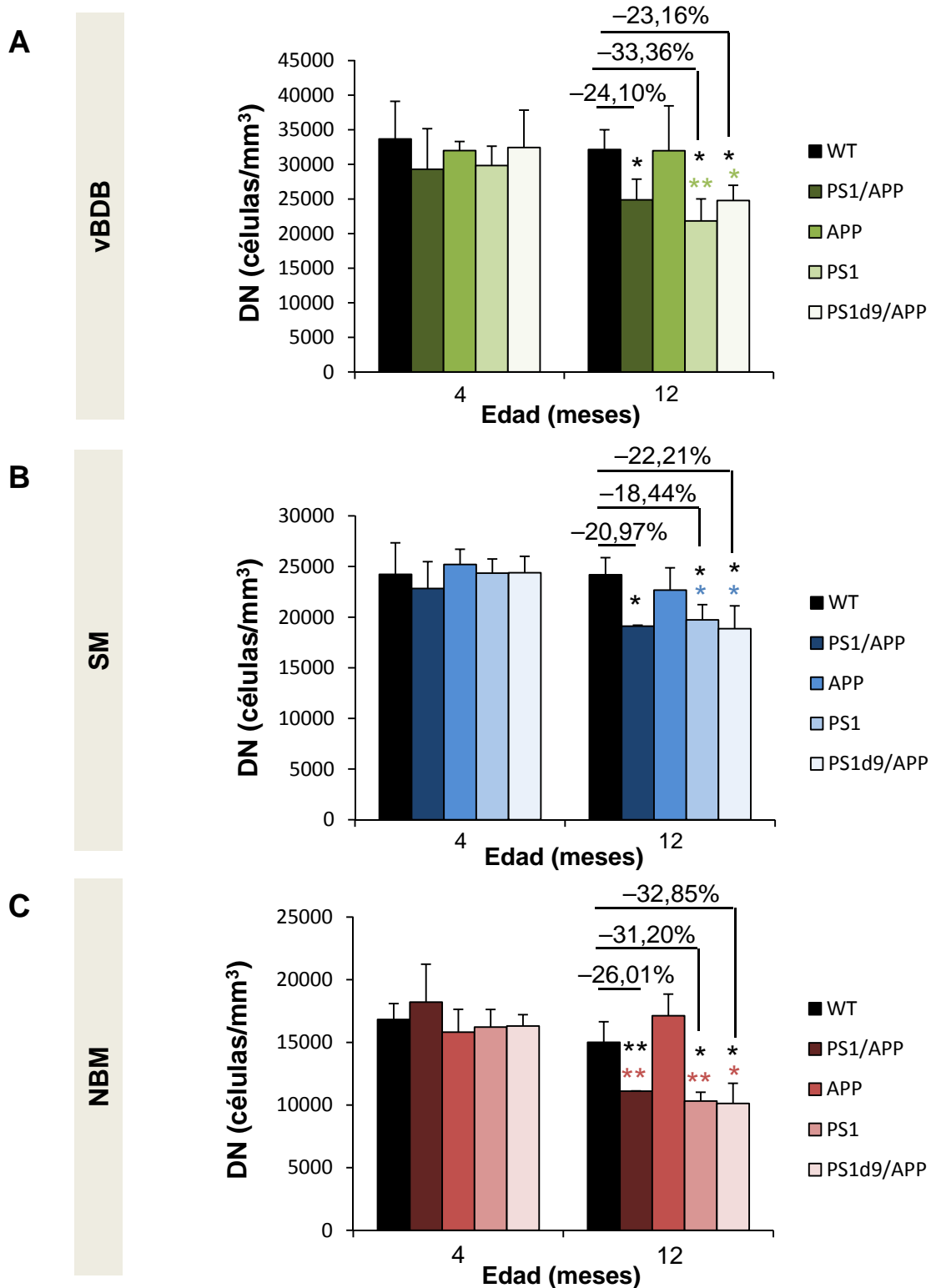


Figura 3.2.5. Reducción significativa de neuronas ChAT-positivas en el telencéfalo basal. Cuantificación estereológica de células ChAT-positivas en animales WT, PS1/APP, APP, PS1 y PS1d9/APP de 4 y 12 meses de edad en el vBDB (A), SM (B) y NBM (C), que demuestra una reducción significativa del número de neuronas colinérgicas en los animales tg PS1/APP, PS1 y PS1d9/APP en comparación con los WT a los 12 meses de edad en los tres núcleos analizados. No se observan diferencias entre los animales WT y APP en ninguna de las áreas del telencéfalo basal a ninguna de las edades estudiadas. Los datos se representan como la media±SD, y fueron analizados por un ADEVA de 1 vía ($F(9,25)=6,548$, $p<0,001$), seguido de un *post-hoc* de Tukey, ** $p<0,01$, * $p<0,05$; el asterisco en color indica la significancia de la diferencia en la DN entre animales de un mismo genotipo a los 4 y 12 meses de edad. $n=4$ por grupo, 3 secciones por animal.

y PS1d9/APP ($-22,21\pm 9,34\%$) a los 12 meses de edad, sin que se produjeran cambios en los animales APP. A los 4 meses de edad no se detectaron cambios en ninguno de los modelos animales analizados ($n=4$, 3 secciones/animal; ADEVA de 1 vía, *post-hoc* de Tukey, $*p<0,05$).

Por último, el análisis cuantitativo de células ChAT-positivas (tamaño del *frame*: $926,39 \mu\text{m}^2$; 40 % de área escaneada) en el NBM (Fig. 3.2.5C) mostró una disminución significativa a los 12 meses en los animales PS1/APP ($-26,01\pm 0,16\%$). Del mismo modo a lo descrito para los núcleos anteriores, esta reducción también se observó para los animales simple transgénicos PS1 ($-31,20\pm 4,67\%$) y doble transgénicos PS1d9/APP ($-32,85\pm 10,67\%$), con respecto a los animales WT de la misma edad. No se observaron diferencias significativas entre los animales WT y APP de 12 meses de edad ni entre ninguno de los genotipos analizados a los 4 meses ($n=4$, 3 secciones/animal; ADEVA de 1 vía, *post-hoc* de Tukey, $**p<0,01$, $*p<0,05$), corroborando lo observado en las imágenes de campo claro mostradas en la Fig. 3.2.4.

El análisis de la expresión de los niveles de ARNm para ChAT, mediante RT-PCR, en el telencéfalo basal de los animales WT y PS1/APP (Fig. 3.2.6), mostró una reducción en los animales transgénicos a partir de los 12 meses de edad, coincidiendo con la edad de pérdida neuronal analizada mediante inmunohistoquímica. Esto apoya la idea de degeneración de las células colinérgicas en el telencéfalo basal de los animales doble transgénicos PS1/APP.

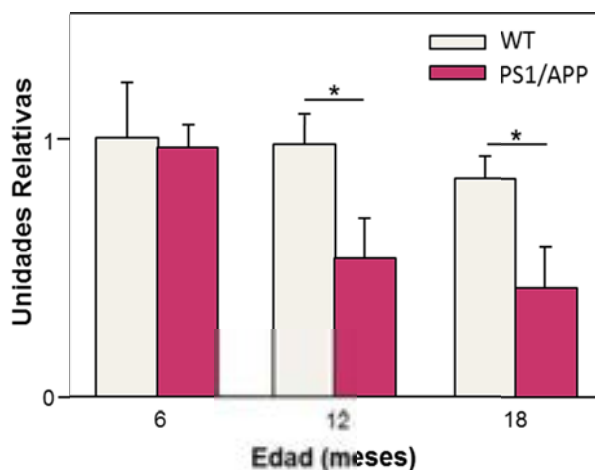


Figura 3.2.6. Análisis de la expresión de ChAT en el telencéfalo basal de animales WT y PS1/APP. Mediante RT-PCR se analizó la expresión del marcador ChAT en el prosencéfalo basal de animales WT y PS1/APP a los 6, 12 y 18 meses de edad. Se detectó una reducción significativa en este marcador a partir de los 12 meses de edad en los animales transgénicos. Datos representados como $\text{media}\pm\text{SD}$ y analizados mediante un ADEVA de 1 vía ($F(5,24)=14,79$, $p=0,00001$), $*p<0,05$. $n=4$ por grupo.

El siguiente paso, consistió en corroborar que lo observado era una pérdida neuronal de células colinérgicas en nuestro modelo animal PS1/APP, y no una simple pérdida del fenotipo ChAT por parte de estas células (Fig. 3.2.7). Para ello, buscamos otro marcador independiente del fenotipo colinérgico que pudiera identificar a esta población neuronal. Mediante inmunofluorescencia doble a microscopía confocal comprobamos que las células ChAT coexpresaban el receptor de baja afinidad del factor de crecimiento nervioso, p75, de manera que valida su uso como marcador de la misma población celular. Los resultados

mostraron que todas las células ChAT eran además p75-positivas (Fig. 3.2.7A-B). De hecho, ya ha sido previamente descrito que el receptor de neurotrofinas p75 es altamente expresado por las neuronas colinérgicas del telencéfalo basal (Coulson y col., 2009; Ovsepián y Herms, 2013).

La cuantificación estereológica de la población de neuronas p75-positivas (tamaño del *frame*: $926,39\mu\text{m}^2$; 40% de área escaneada; Fig. 3.2.7C) en el vBDB (Fig. 3.2.7C1) y en el SM (Fig. 3.2.7C2) reveló una disminución significativa en los animales PS1/APP con respecto a los WT a los 12 meses de edad en los diferentes núcleos del telencéfalo basal analizados ($-17,48\pm 6,60\%$ en el vBDB; $-25,89\pm 2,05\%$ en el SM; $n=4$, 3 secciones/animal; t-test Mann-Whitney, $***p<0,001$, $*p<0,05$), que era similar a la observada para el marcador ChAT en estos núcleos a los 12 meses ($-24,10\pm 9,15\%$ en el vBDB; $-20,97\pm 0,40\%$ en el SM). Estos resultados indican que la pérdida de neuronas ChAT-positivas se debe a la muerte neuronal y no a la pérdida del fenotipo colinérgico, pues la disminución de neuronas p75-positivas no mostraba diferencias significativas con la de ChAT-positivas.

Además, para confirmar que se trata de la misma población y en apoyo de la existencia de muerte neuronal, realizamos la cuantificación estereológica (tamaño del *frame*: $22922\mu\text{m}^2$; 40% de área escaneada) de las células doblemente marcadas tanto para ChAT como para p75 (Fig. 3.2.7D) en el vBDB (Fig. 3.2.7D1) y en el SM (Fig. 3.2.7D2) en los animales WT y PS1/APP a los 12 meses de edad. Esta cuantificación mostró una reducción significativa, similar a la obtenida para ChAT o p75 individualmente, en la densidad de células ChAT/p75 en los animales PS1/APP ($-25,65\pm 4,14\%$ en el vBDB; $-25,81\pm 6,73\%$ en el SM; $n=4$, 3 secciones/animal; t-test Mann-Whitney, $**p<0,01$, $*p<0,05$).

Una última confirmación de la pérdida neuronal en los núcleos del telencéfalo basal, en concreto del NBM, consistió en la cuantificación del número total de neuronas utilizando para ello el marcaje con NeuN (Fig. 3.2.8), marcador de núcleos de neuronas maduras. Para ello se realizó una doble inmunohistoquímica (Fig. 3.2.8A3 y detalles en Fig. 3.2.8B) para campo claro utilizando un anticuerpo específico para ChAT (revelado con DAB-níquel) junto con anti-NeuN (revelado con DAB). Utilizando estas secciones, se llevó a cabo la cuantificación estereológica de la densidad numérica (tamaño del *frame*: $926,39\mu\text{m}^2$; 40% de área escaneada) tanto de la población de neuronas ChAT-positivas (Fig. 3.2.8C1) como de todas las neuronas maduras NeuN-positivas (Fig. 3.2.8C2). Esta última cuantificación mostró una reducción significativa en la densidad numérica de las neuronas totales maduras en el NBM en los animales PS1/APP ($-26,73\%$; $n=4$, 3 secciones/animal; t-test Mann-Whitney, $*p<0,05$) a los 12 meses de edad. Debido a que la población neuronal en el NBM es diversa y que el número de células/ mm^3 de NeuN es mayor que el de neuronas colinérgicas, esta pérdida neuronal indica que, además de una

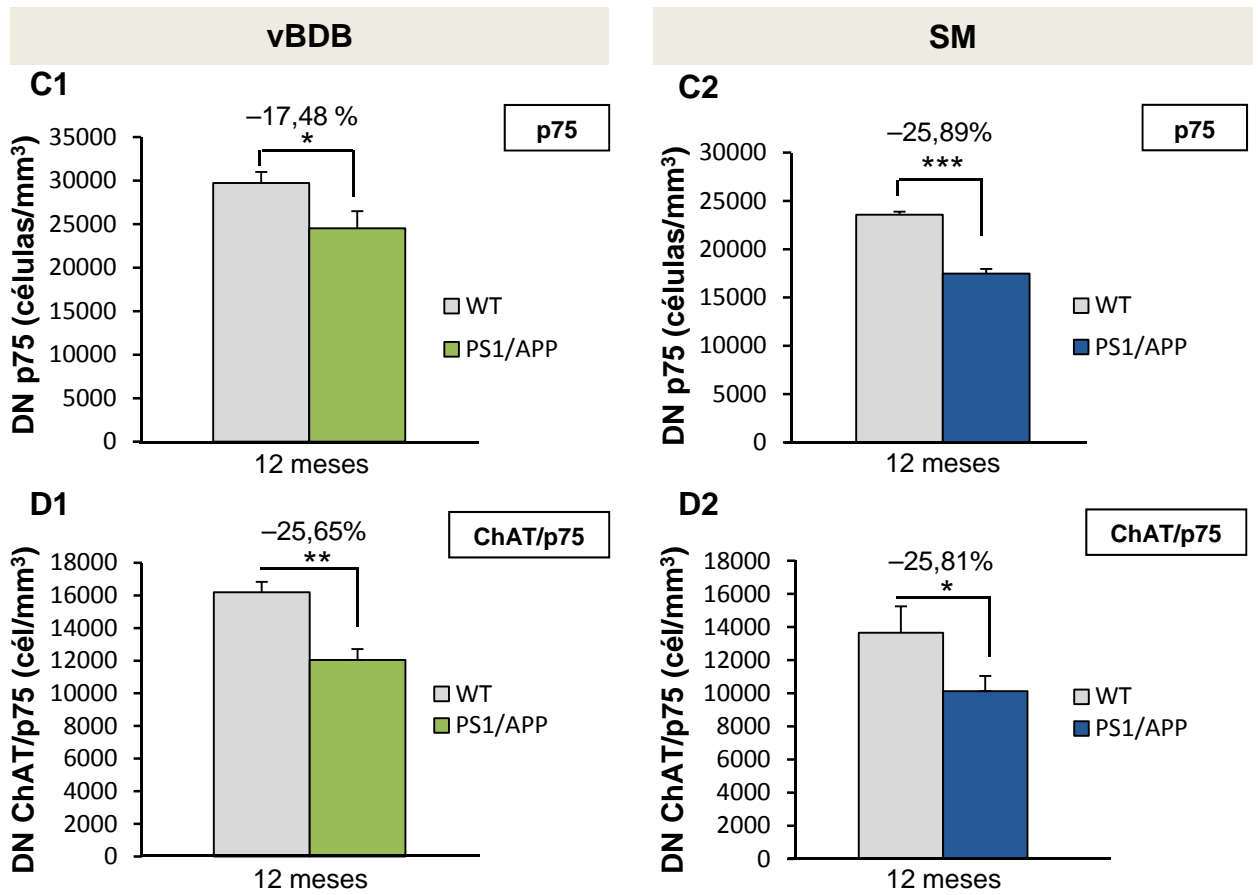
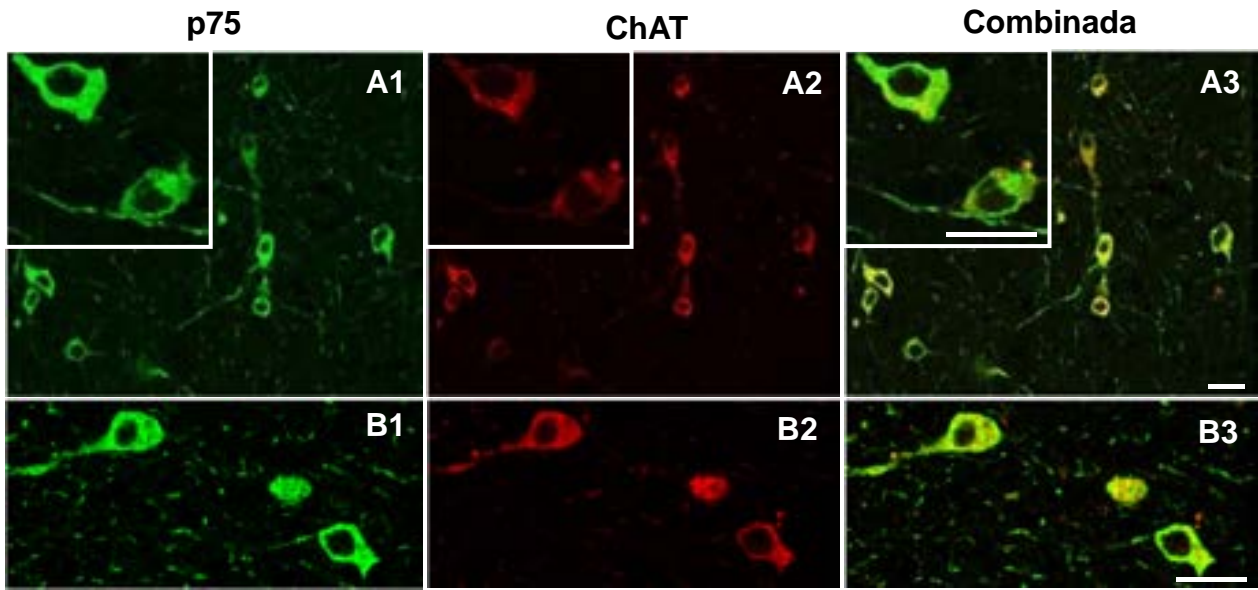


Figura 3.2.7. Pérdida neuronal de células ChAT-positivas y p75-positivas en el vBDB y SM. El doble inmunomarcaje confocal (A-B) muestra colocalización entre p75 (A1, B1) y ChAT (A2, B2) en neuronas del telencéfalo basal a los 12 meses de edad. La cuantificación estereológica mostró una reducción de las células p75 en el vBDB (C1) y el SM (C2) a los 12 meses similar a la observada para la población de neuronas colinérgicas, ya que ambos marcadores identifican a la misma población celular. La cuantificación estereológica de secciones con doble inmunomarcaje para ChAT y p75 mostró una disminución en esta población a los 12 meses de edad en el vBDB (D1) y el SM (D2). Los datos se representan por la media \pm SD y fueron analizados por un t-test Mann-Whitney, *** p <0,001, ** p <0,01, * p <0,05. n =4 por grupo, 3 secciones por animal. Barras de escala: 20 μ m.

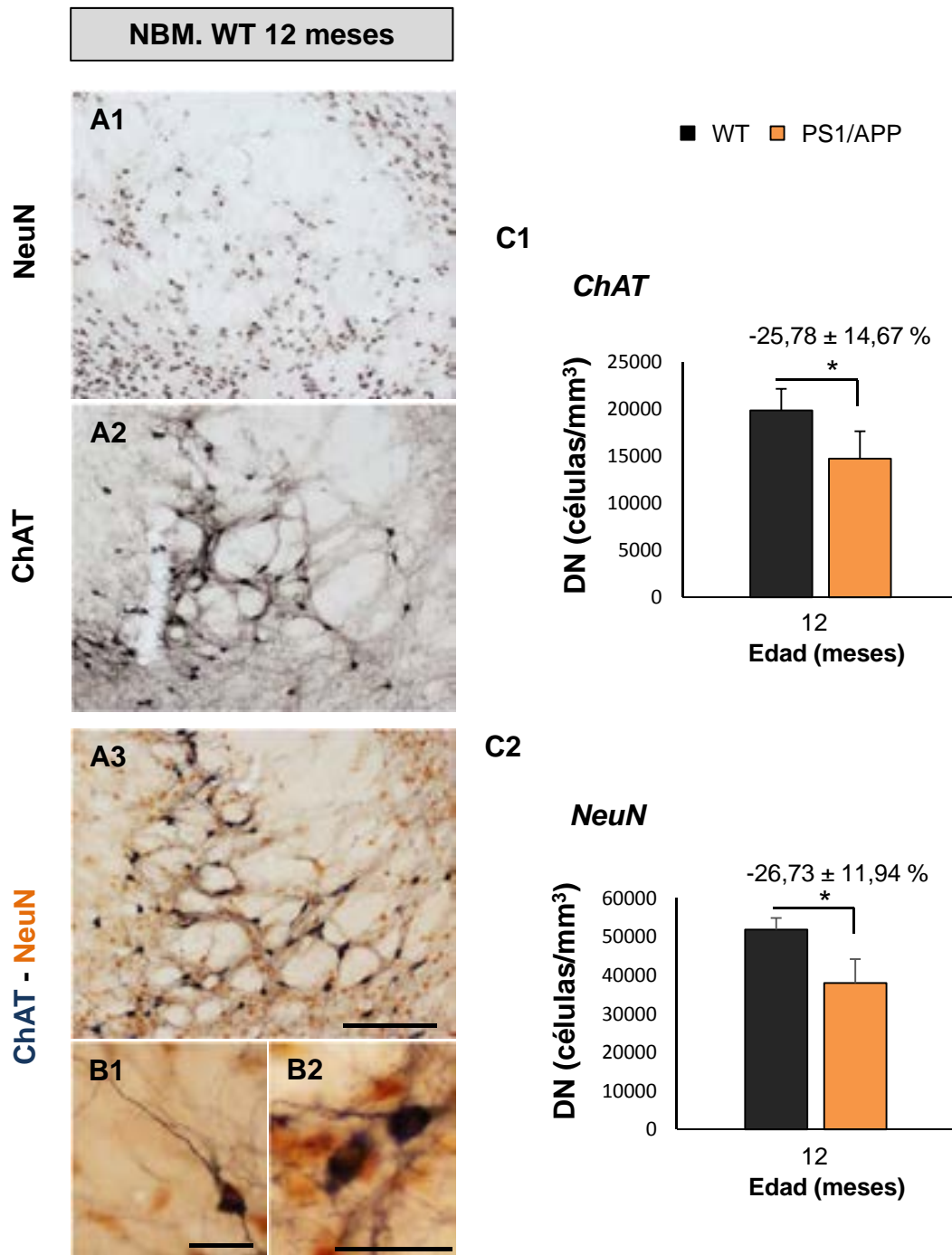


Figura 3.2.8. Pérdida neuronal en el NBM de animales PS1/APP a los 12 meses de edad. Imágenes de microscopía de campo claro de una inmunohistoquímica para NeuN (A1), ChAT (A2) y una doble inmunohistoquímica ChAT-NeuN (A3 y B), en el NBM de animales PS1/APP de 12 meses. La cuantificación estereológica muestra una reducción en la densidad numérica (células/mm³) en este núcleo para la población ChAT-positiva (C1) así como para el marcador neuronal NeuN (C2). Los datos se representan por la media±SD y fueron analizados por un t-test Mann-Whitney ($p=0,0286$ para ChAT; $p=0,0286$ para NeuN). * $p<0,05$, $n=4$ por grupo, 3 secciones por animal. Barras de escala: A, 200 μm ; B, 50 μm .

disminución en la población colinérgica en este núcleo debe haber una reducción de otra u otras poblaciones neuronales que quedarían por determinar. Esto no hace más que confirmar la pérdida de células ChAT-positivas en el NBM de los animales PS1/APP.

Por último, decidimos analizar esta población colinérgica en un modelo animal TAU, ya que las causas de la degeneración colinérgica y el papel de formas tóxicas de Abeta y/o Tau en esta pérdida neuronal selectiva aún no se conocen. Además, se ha descrito que esta población neuronal, en estadios tempranos de la EA, muestran degeneración neurofibrilar (Sassin y col., 2000; Mesulam y col., 2004; Craig y col., 2011). Así, en el modelo Thy-Tau22 se detectó una disminución significativa en la densidad numérica de células ChAT-positivas, determinada mediante cuantificación estereológica (tamaño del *frame*: 926,39 μm^2 ; 40% de área escaneada), a los 12 meses de edad en el núcleo vertical de la banda diagonal de Broca ($-20,12 \pm 9,72\%$; Fig. 3.2.9A), en el *septum* medial ($-32,58 \pm 9,97\%$; Fig. 3.2.9B) y en el núcleo basal de Meynert ($-35,53 \pm 4,07\%$; Fig. 3.2.9C; para todos los casos, $n=3$, 3 secciones/animal; t-test Mann-Whitney, $**p<0,01$, $*p<0,05$). Esta reducción significativa en el número de células colinérgicas en este modelo animal se puede observar en las imágenes de microscopía de campo claro para la inmunohistoquímica con anti-ChAT en los diferentes núcleos analizados (Figura 3.2.9).

3.2.2. Alteración de los terminales colinérgicos hipocampales

El hipocampo recibe inervación colinérgica del complejo formado por el núcleo vertical de la banda diagonal de Broca y el *septum* medial (Fig. 3.2.10A). Esta inervación presenta una organización característica dentro del hipocampo y el giro dentado, de manera que el inmunomarcaje para ChAT (presentado aquí para un animal WT de 4 meses de edad) en estas regiones muestra un patrón similar al descrito previamente para el marcador del transportador vesicular de ChAT (VChAT; Schafer y col., 1998). Como se observa en la Fig. 3.2.10B-G, la densidad de axones ChAT-positivos es moderada en el *stratum oriens* e incrementa hacia la capa piramidal, formando una banda densa de terminales en la región frontera entre el *stratum oriens* y la capa piramidal (que aquí hemos definido como plexo yuxtapiramidal). La densidad de estas fibras desciende desde la capa piramidal hacia el *stratum radiatum* y se incrementa en una delgada banda del *stratum lacunosum-moleculare* (ver detalle en Fig. 3.2.10G). En la región de CA2/CA3 (detalle en Fig. 3.2.10D), la densidad ChAT es alta en la capa piramidal, siendo muy leve en el *stratum lucidum*. En las capas del giro dentado (detalle en Fig. 3.2.10E), la densidad de fibras inmunorreactivas para ChAT más alta está presente en el área que se extiende a lo largo de la capa de células granulares formando un plexo yuxtgranular en la interfaz entre la capa de células granulares y la capa molecular. Una inmunotinción muy débil se observa en la capa de células granulares y solo unas pocas fibras en la región hilar (Leranth y Hajszan, 2007). De moderada a alta es la densidad de fibras ChAT-positivas que se observa en la capa molecular.

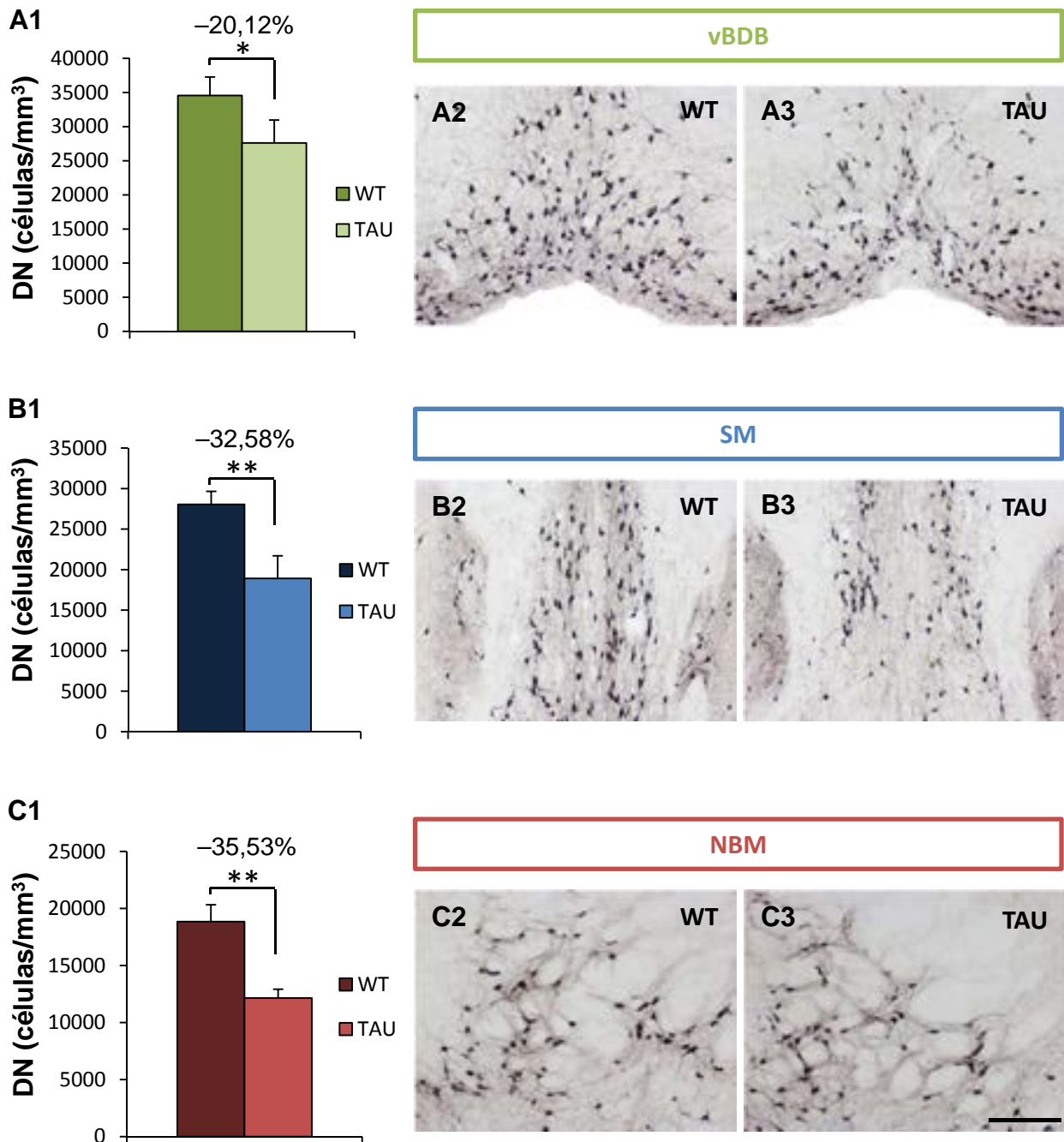


Figura 3.2.9. Pérdida neuronal de células ChAT-positivas en el modelo Thy-Tau22. La cuantificación estereológica (células/mm³) de las células inmunorreactivas para ChAT en el vBDB (A), SM (B) y NBM (C), mostró una disminución significativa en los animales TAU a los 12 meses de edad con respecto a los WT. A1-A2, B1-B2 y C1-C2 son imágenes representativas de la inmunotinción con anti-ChAT en estos núcleos. Los datos se representan por la media±SD y fueron analizados por un t-test Mann-Whitney ($p=0,049$ para vBDB; $p=0,008$ para SM; $p=0,002$ para NBM). ** $p<0,01$, * $p<0,05$. $n=3$ por grupo, 3 secciones por animal. Barras de escala: 200 μm .

Para precisar si la pérdida de neuronas colinérgicas descrita anteriormente en los núcleos SM y vBDB de los modelos transgénicos PS1/APP, PS1 y TAU conllevaba una reducción paralela de la inervación colinérgica a nivel del hipocampo respecto a los animales WT y los transgénicos APP, se determinó la densidad (medida como porcentaje de área ocupada por fibras colinérgicas inmunorreactivas) de los terminales colinérgicos en el plexo yuxtapiromidal de CA1 (Fig. 3.2.11). Al analizar las imágenes de secciones inmunoteñidas con ChAT, pudimos observar una menor densidad de terminales en el plexo yuxtapiromidal en nuestro modelo PS1/APP a los 12 meses de edad, en comparación con los animales WT. Esta disminución también se detectó en aquellos modelos transgénicos, PS1 y TAU, que también habían mostrado una menor densidad de células colinérgicas a los 12 meses. Los animales APP sin embargo no mostraban ninguna diferencia en el plexo yuxtapiromidal con respecto a los WT a los 12 meses, y ninguno de los grupos analizados mostró diferencias de inmunotinción de esta banda yuxtapiromidal a los 4 meses de edad.

En aquellos animales transgénicos que presentaban mutaciones en el gen *APP* (animales PS1/APP y APP), se detectó la presencia de neuritas distróficas positivas para ChAT. Estas distrofias aparecen más temprano en los animales PS1/APP, en los que se detectaron a los 4 meses de edad (inserto en Fig. 3.2.11B1). A los 12 meses, se observaban tanto en los animales PS1/APP como en los APP, aunque con una mayor abundancia en los doble transgénicos. Estas distrofias aparecían alrededor de unas áreas inmunonegativas para ChAT, que se corresponden con las regiones ocupadas por placas de A β (Fig. 3.2.11B2 y C2).

En cuanto a la disminución a nivel cualitativo observada en la inmunotinción para ChAT en el plexo yuxtapiromidal, fue corroborada cuantitativamente (Fig. 3.2.11F), obteniéndose una reducción significativa en el porcentaje de la capa yuxtapiromidal ocupada por fibras colinérgicas, a los 12 meses de edad, en los animales PS1/APP ($-39,75\pm 3,87\%$ con respecto a los WT), PS1 ($-28,66\pm 11,94\%$ en relación a los WT) y TAU ($-42,64\pm 9,53\%$ con respecto a los WT), sin detectarse diferencias significativas entre los animales WT y APP ($n=4, 5$ secciones/animal; ADEVA de 1 vía, *post-hoc* de Tukey, $***p<0,001, **p<0,01$).

Esta reducción en los terminales colinérgicos hipocampales en los animales transgénicos se corroboró mediante análisis por *Western-blot* del marcador ChAT en animales transgénicos a los 12 meses de edad (Fig. 3.2.12). La cuantificación de los niveles de expresión ChAT (Fig. 3.2.12E) mostró una reducción significativa en los animales transgénicos PS1 y TAU con respecto a los animales WT de la misma edad ($n=3$ animales/grupo; ADEVA de 1 vía, *post-hoc* de Tukey, $*p<0,05$). En los animales doble transgénicos PS1/APP se observó una alta variabilidad y no se obtuvieron diferencias significativas con respecto a los animales WT (aunque si se observó una tendencia a disminuir). Esto puede deberse a la presencia de neuritas distróficas en el hipocampo de estos animales (muy abundantes a los 12 meses) que puede enmascarar la pérdida de los

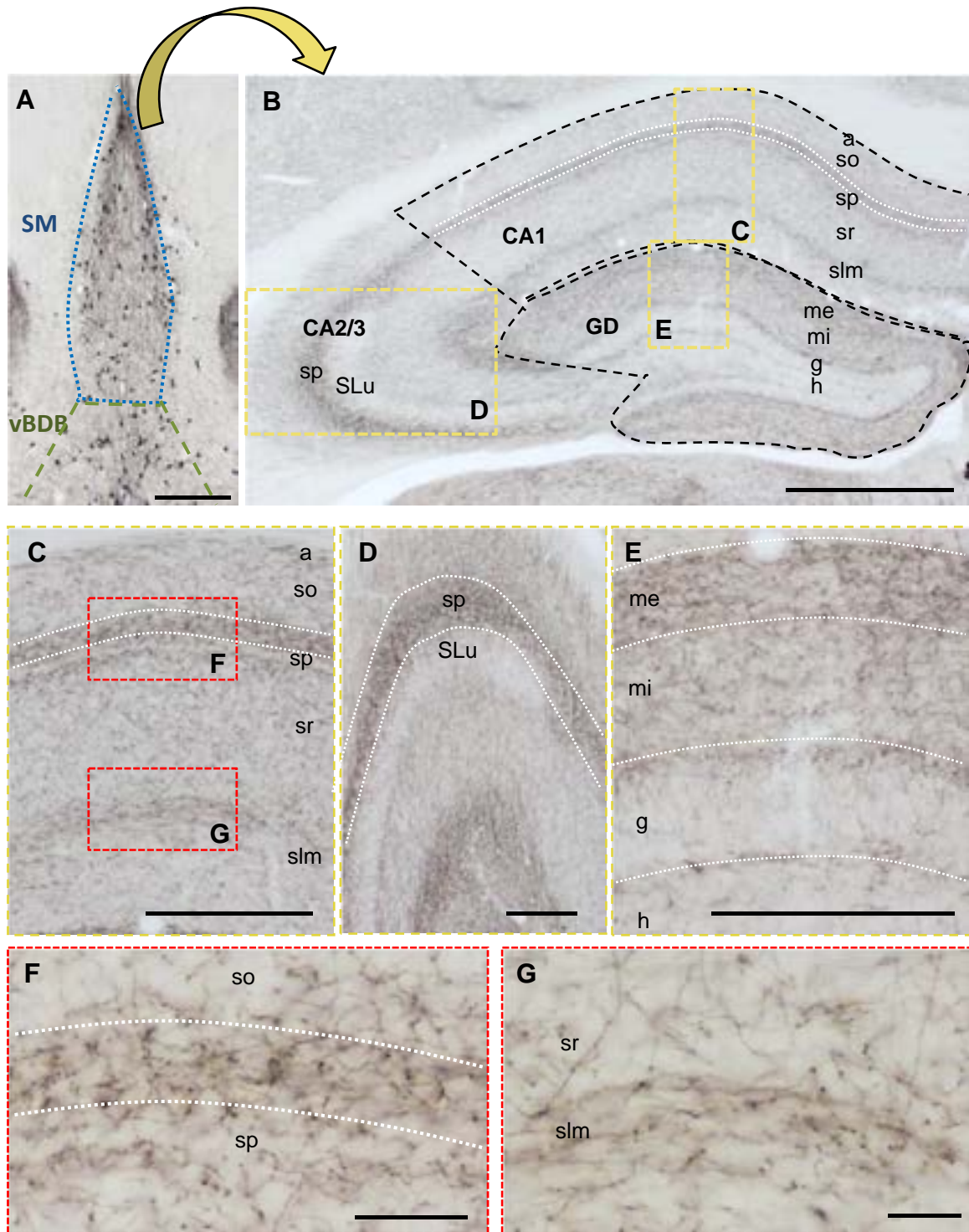


Figura 3.2.10. Inervación colinérgica hipocampal en un animal WT de 4 meses de edad. A) Las células colinérgicas del SM y vBDB proyectan al hipocampo. B) Patrón de tinción inmunohistoquímica ChAT en el hipocampo. Se observa un plexo localizado en la parte adyacente de la capa piramidal (sp) de CA1 (línea de puntos blancas en B, C y F). C-G) Detalles de CA1 (C, F, G), CA2/3 (D) y GD (E). Barras de escala: A, 250 μm ; B, 500 μm ; C-E, 200 μm ; F-G 25 μm . SM: *septum* medial; vBDB: núcleo vertical de la banda diagonal de Broca; GD: giro dentado; a: *alveus*; so: *stratum oriens*; sp: *stratum pyramidal*; sr: *stratum radiatum*; slm: *stratum lacunosum-moleculare*; SLu: *stratum lucidum*; me: capa molecular externa; mi: capa molecular interna; g: capa granular; h: *hilum*.

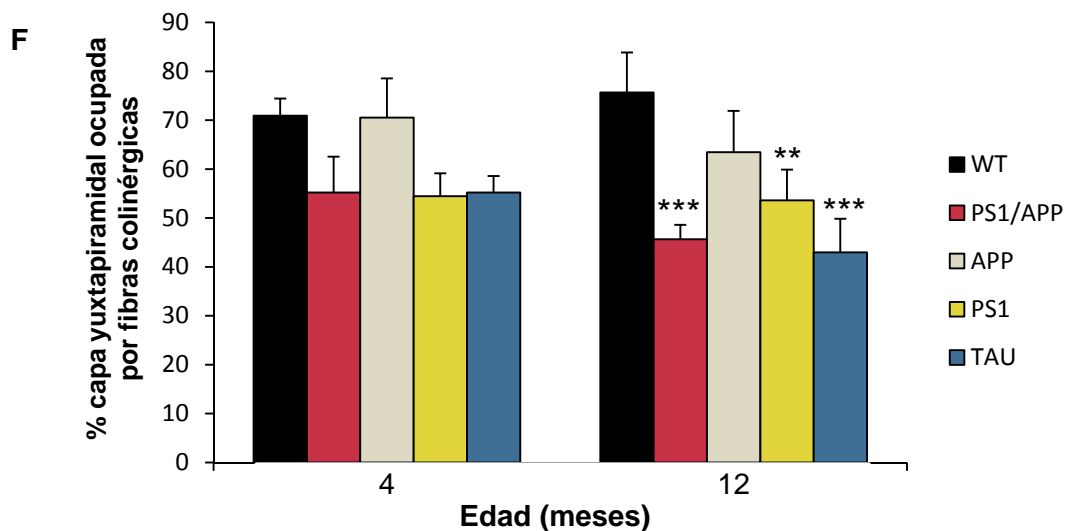
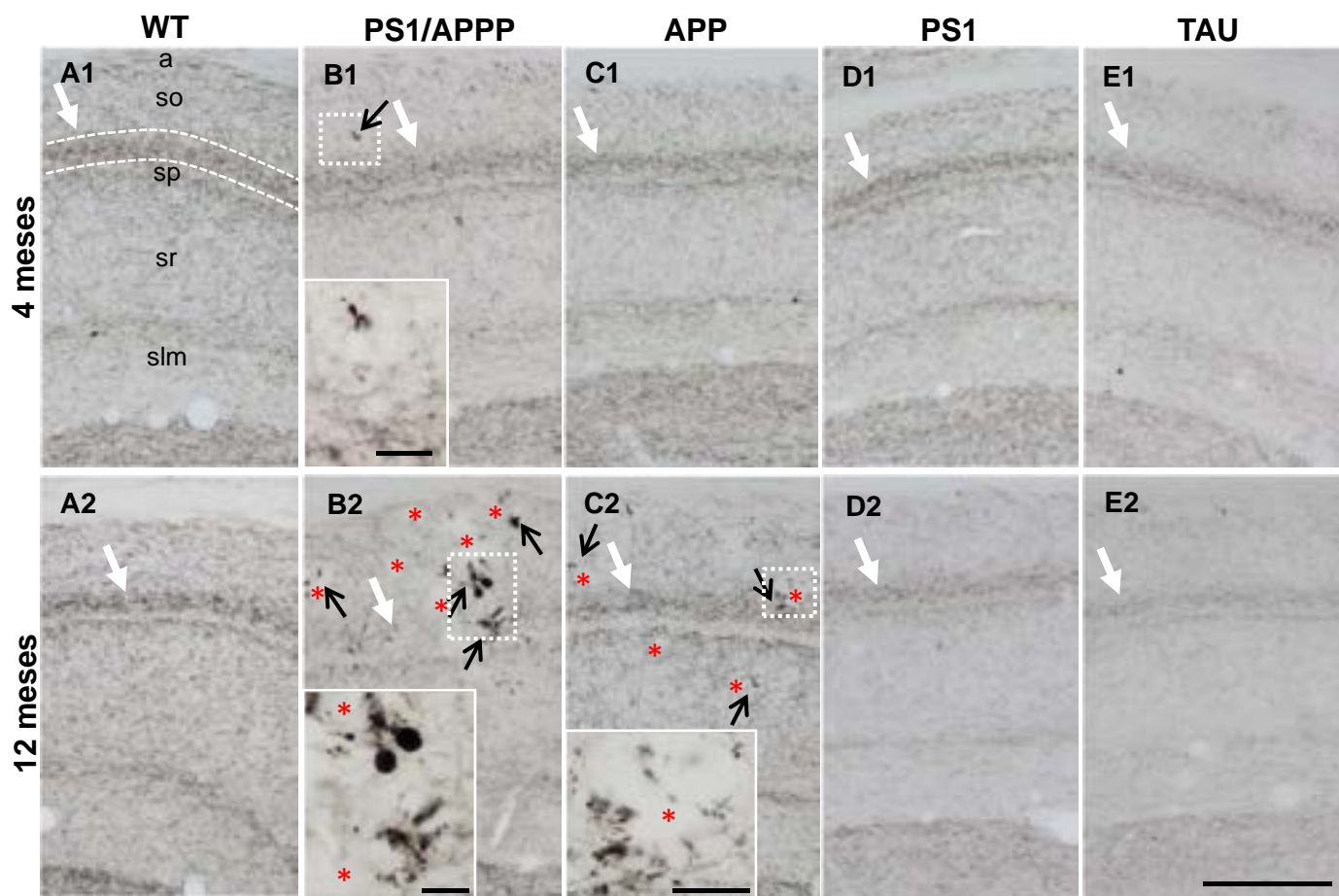


Figura 3.2.11. Alteración de la inervación colinérgica hipocampal en modelos transgénicos de la EA.

A-E) Se observó un descenso en el inmunomarcado del plexo yuxtapiamidal (flechas blancas) en los animales PS1/APP (B), PS1 (D) y TAU (E) a los 12 meses, en comparación con los WT (A) y APP (C) de la misma edad. Esta disminución, en los animales PS1/APP y PS1, se corroboró mediante la cuantificación del porcentaje del área de la capa yuxtapiamidal de CA1 ocupada por las fibras colinérgicas (F). Por otro lado, se detectaron distrofias ChAT-positivas en los animales PS1/APP y APP (flechas negras; detalles en insertos en B1, B2 y C2) dispuestas alrededor de áreas inmunonegativas para ChAT que parecen corresponder con placas de A β (asteriscos rojos). Los datos se representaron como la media \pm SD y se analizaron por un ADEVA de 1 vía ($F(7,25)=9,321, p<0,0001$), seguido de un *post-hoc* de Tukey, $***p<0,001$, $**p<0,01$. $n=4$ por grupo, 5 secciones por animal. Barras de escala: A-D, 200 μ m; insertos, 25 μ m. a: *alveus*; so: *stratum oriens*; sp: *stratum pyramidale*; sr: *stratum radiatum*; slm: *stratum lacunosum-moleculare*.

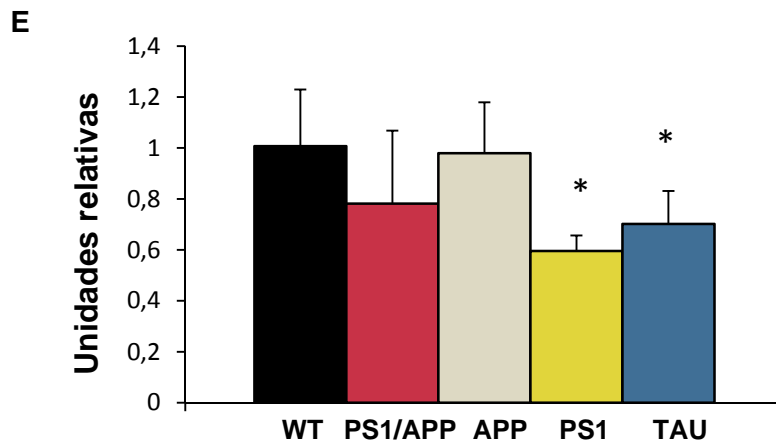
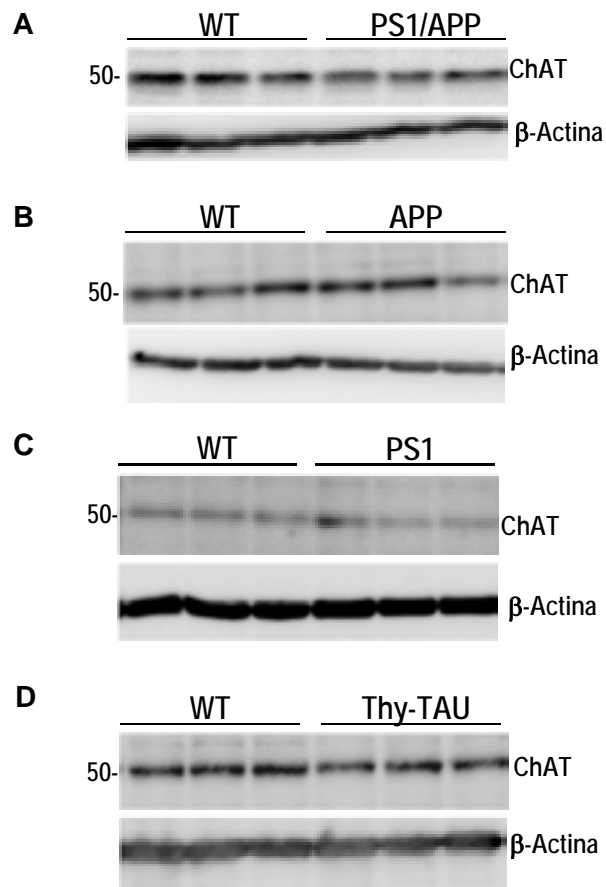


Figura 3.2.12. Reducción del marcador ChAT en el hipocampo de diferentes modelos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer a los 12 meses de edad. *Western-blot* representativos de los niveles de ChAT en animales PS1/APP (A), APP (B), PS1 (C) y Thy-TAU (D) de 12 meses de edad. La cuantificación (E) mostró una reducción significativa en los niveles de ChAT en los animales PS1 y TAU a los 12 meses de edad en comparación con los animales WT de la misma edad. Los datos se representaron como la media \pm SD y se analizaron por un ADEVA de 1 vía ($F(4,57)=9,00$, $p=0,0001$), seguido de un *post-hoc* de Tukey, $*p<0,05$. $n=3$ animales por grupo.

terminales ChAT al acumularse esta proteína en las distrofias. No se observaron diferencias entre los animales WT y APP.

3.2.3. Patología neurítica colinérgica temprana en el hipocampo y la corteza cerebral

La presencia de neuritas distróficas constituye, junto con la aparición de los depósitos de A β y los NFTs, una lesión histopatológica característica del proceso neurodegenerativo que ocurre en el cerebro de pacientes con EA (Gómez-Isla y col., 2008). Además, esta patología neurítica ha sido reconocida como uno de los primeros indicadores de la enfermedad (Dickson y col., 1999; Dickson y Vickers 2001), y es también uno de los primeros eventos patológicos que acontecen en los distintos modelos transgénicos de la EA (ver revisión Duyckaerts y col., 2008).

Como ya se ha observado en la Fig. 3.2.11, en aquellos modelos animales que portan el gen humano *APP* mutado, se produce la formación de neuritas distróficas positivas para ChAT, al igual que se ha descrito en otros modelos APP, como el APP23 (Choi y col., 2013) y el TgCRND8 (Bellucci y col., 2006). La inmunotinción para ChAT con contratinción con rojo congo para poner de manifiesto las placas de A β , en los animales PS1/APP, reveló que esta población neuronal presentaba una gran cantidad de neuritas distróficas en el hipocampo desde la temprana edad de 4 meses (Fig. 3.2.13A-B), especialmente rodeando placas congofílicas (Fig. 3.2.13a1.1 y Fig. 3.2.13b1.1, para 4 y 12 meses, respectivamente). Como demuestran las imágenes de doble marcaje ChAT/Tio-S las distrofias ChAT-positivas se encuentran asociadas con los depósitos fibrilares de A β (Fig. 3.2.13D). La estrecha asociación existente entre las neuritas distróficas y los depósitos de A β ha sido mostrada en estudios con muestras humanas y en otros modelos transgénicos (Dickson y col., 1999; Woodhouse y col., 2009).

En esta figura podemos observar detalles de distrofias ChAT asociadas a placas de β -amiloide, utilizando distintas técnicas. Así, mediante microscopía confocal (Fig. 3.2.13D), se observa la estrecha asociación de las neuritas ChAT-positivas (en rojo) con las placas (teñidas con Tio-S, de color verde). Esta íntima asociación también se observó mediante microscopía óptica (en Fig. 3.2.13a1.1 y Fig. 3.2.13b1.1 se muestra el detalle de una placa congofílica estrechamente asociada a neuritas distróficas colinérgicas a 4 y 12 meses de edad, respectivamente).

El número de neuritas distróficas aumentó en paralelo a la edad de los animales y la carga amiloide, como se observa en las imágenes y como corroboró la cuantificación (Fig. 3.2.12C) del porcentaje del área de CA1 ocupada por estas distrofias, que mostró un incremento del $64,71 \pm 20,23\%$ desde los 4 a los 12 meses de edad en los animales PS1/APP (n=4 por grupo, 5 secciones por animal; t-test Mann-Whitney, ***p<0,001).

Del mismo modo a lo observado en el hipocampo, en las áreas corticales también se observa una patología distrófica colinérgica (Fig. 3.2.14) en los animales PS1/APP. En este

caso, observamos neuritas distróficas positivas para ChAT a los 4 meses de edad en las cortezas retrosplenial granular (Fig. 3.2.14A) y visual primaria (Fig. 3.2.14B), y su número incrementa progresivamente con la edad. Además, se detecta cualitativamente una reducción en la cantidad de fibras ChAT-positivas por todo el neuropilo de estas regiones corticales. Estas distrofias, de la misma forma a lo descrito para el hipocampo, se encuentran estrechamente asociadas a los depósitos amiloides congófilicos (ver detalles 1-3). En concreto, para la RSG se observa una banda inmunorreactiva para ChAT a lo largo de la capa III, que ha sido descrita previamente por otros autores (Robertson y col., 2009), que coincide con una mayor deposición de A β . A estas áreas corticales proyectan las neuronas colinérgicas presentes en el núcleo basal de Meynert.

Las distrofias colinérgicas son positivas a marcadores de patología axonal como los relacionados con alteración de la proteostasis por acumulación de vesículas autofágicas/lisosomales y la alteración del citoesqueleto y/o transporte axonal (Fig. 3.2.15).

Para ver la naturaleza autofágica de las vesículas acumuladas en las distrofias axonales colinérgicas, se realizó una doble inmunotinción a microscopía confocal para el marcador de vesículas autofágicas LC3b (rojo) y para ChAT (verde; Fig. 3.2.15A). La forma b de la proteína LC3 se obtiene por lipidación (conjugación con fosfatidiletanolamina) de la forma inicial soluble (LC3a), que así se asocia con las membranas de los autofagosomas, siendo esencial en su formación y manteniéndose en ellos hasta su fusión con los lisosomas. LC3b es, por tanto, ampliamente utilizado como marcador de autofagia. Aquí podemos observar la acumulación de vesículas autofágicas (positivas para LC3b) en las distrofias axonales ChAT-positivas, y la disposición de éstas alrededor de las placas de A β . Las distrofias ChAT-positivas también son positivas para, el marcador lisosomal LAMP2 (Fig. 3.2.15B), demostrándose de nuevo la acumulación de vesículas de naturaleza autofágica/lisosomal en estas porciones axonales.

Teniendo en cuenta que la acumulación de vesículas y la consecuente formación de distrofias puede ser originado por fallos en el transporte axonal, y que la fosforilación de Tau provoca la desestabilización de los microtúbulos, decidimos ver la si existe colocalización entre ChAT y el marcador AT8, que reconoce la proteína Tau fosforilada en los residuos Ser202/Thr205 (Fig. 3.2.15C). Los resultados del doble inmunomarcaje ChAT/AT8 revelaron que en numerosas, aunque no en todas, las distrofias colinérgicas existe presencia de fosfo-Tau (ver imagen C3 en Fig. 3.2.15).

Las distrofias axonales colinérgicas también fueron observadas en el modelo PS1, aunque con muy baja frecuencia y solo a partir de los 12 meses de edad (Fig. 3.2.16). Se apreciaron tanto en el hipocampo (Fig. 3.2.16A) como en la corteza cerebral (Fig. 3.2.16B), a pesar de la ausencia de placas de Abeta en este modelo animal.

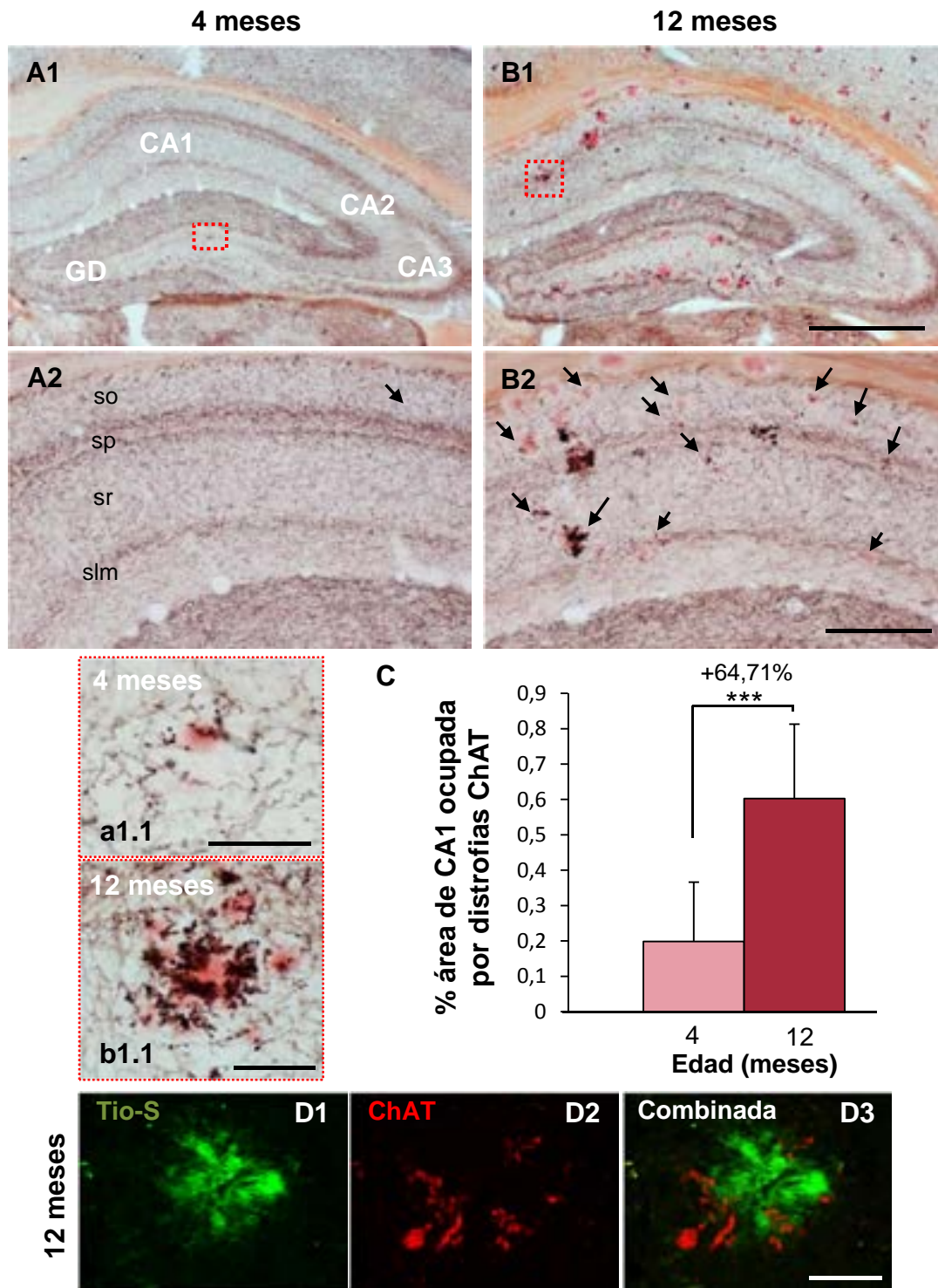


Figura 3.2.13. Patología distrófica de los axones ChAT-positivos en el hipocampo de ratones PS1/APP. A-B) Patrón inmunohistoquímico para ChAT en el hipocampo de ratones PS1/APP a 4 y 12 meses de edad. Las secciones fueron contrateñidas con rojo congó para las placas de Aβ. Se detectó un incremento (+64,71±20,23% a los 12 meses de edad en comparación con los 4 meses) en el área de CA1 ocupada por distrofias ChAT (flechas negras) (C), como se puede observar en las imágenes de detalle (a1.1 para 4 meses y b1.1 para 12 meses). Los axones distróficos se localizaban alrededor de las placas de Aβ (D). Los datos se representan como la media±SD, y fueron analizados mediante t-test Mann-Whitney, ***p<0,001. n=4 por grupo, 5 secciones por animal. Barras de escala: A1-B1, 500 μm; A2-B2, 200 μm; a1.1-b1.1, 25 μm; D, 20 μm. GD: giro dentado; so: *stratum oriens*; sp: *stratum pyramidale*; sr: *stratum radiatum*; slm: *stratum lacunosum-moleculare*.

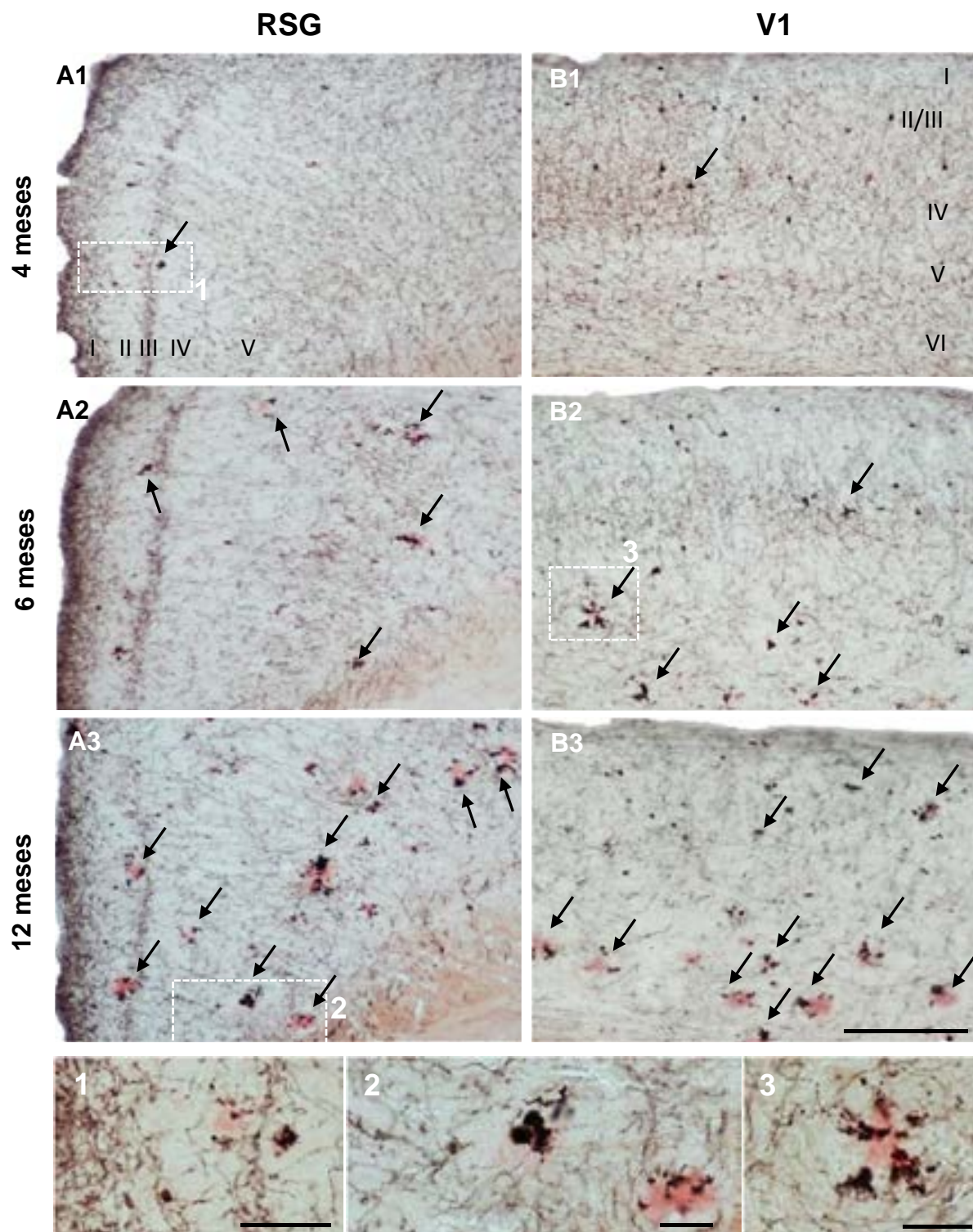


Figura 3.2.14. Patología axonal distrófica ChAT en la corteza de ratones PS1/APP. A-B) Patrón inmunohistoquímico para ChAT en la corteza retrosplenial granular, RSG (A) y visual primaria, V1 (B) de ratones PS1/APP. La corteza recibe inervación extrínseca procedente de células colinérgicas del NBM. La patología distrófica empieza a los 4 meses e incrementa con la edad. Las secciones fueron contrateñidas con rojo congo para la visualización de las placas de Abeta. Las neuritas distróficas ChAT positivas (flechas negras) se localizaban alrededor de las placas de Abeta. I-VI: capas corticales Barras de escala: A-B, 200 μ m; detalles 1-3, 50 μ m.

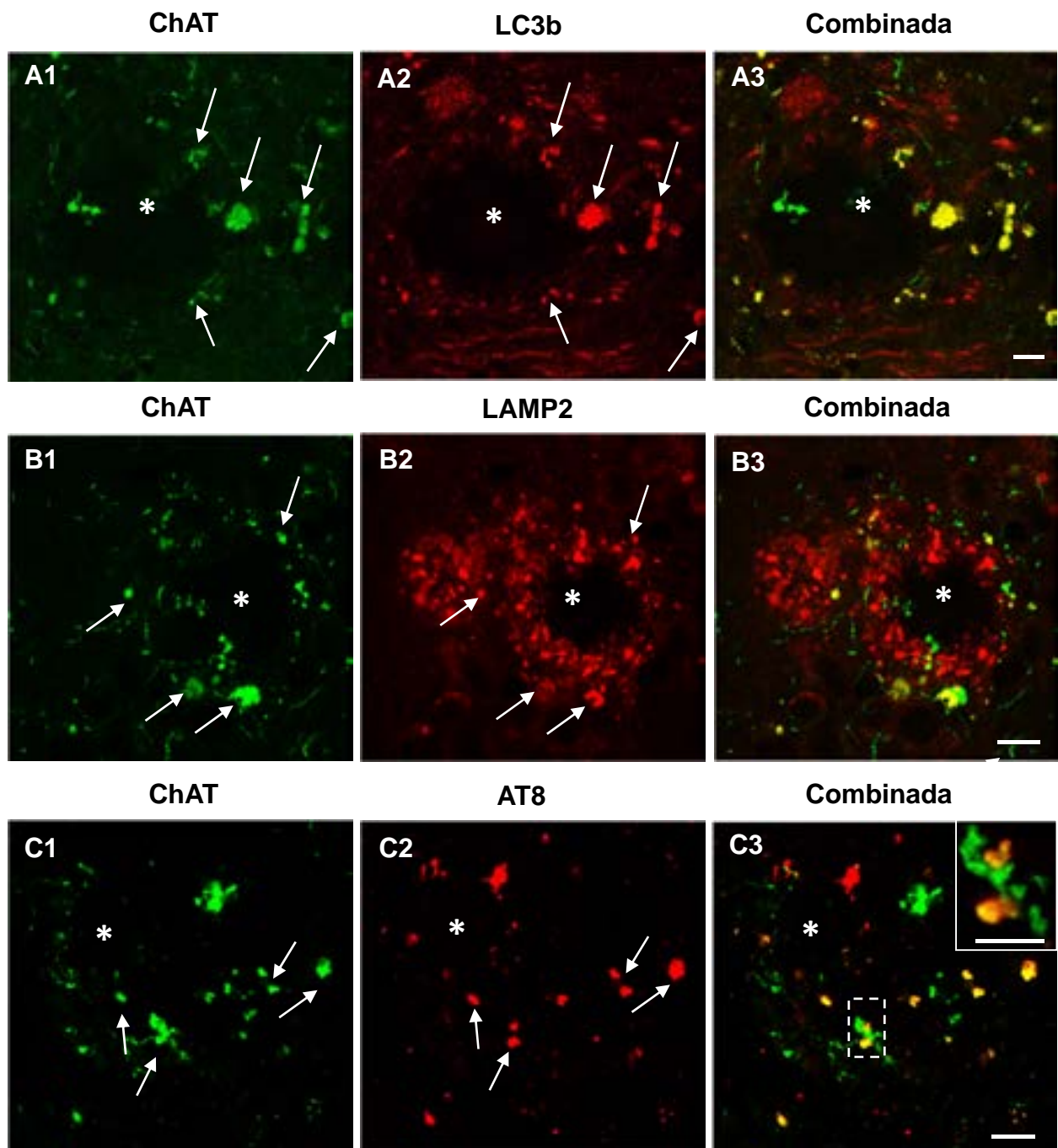


Figura 3.2.15. Co-localización de ChAT con diversos marcadores de distrofias en el hipocampo de animales PS1/APP. En los animales PS1/APP las distrofias positivas para ChAT (verde) se localizan alrededor de las placas de Abeta (asterisco), y son positivas para el marcador de autofagia LC3b (A), el marcador lisosomal LAMP2 (B) y el marcador de Tau fosforilado AT8 (C). Barras de escala: A-C, 10 μ m; inserto en C3, 5 μ m.

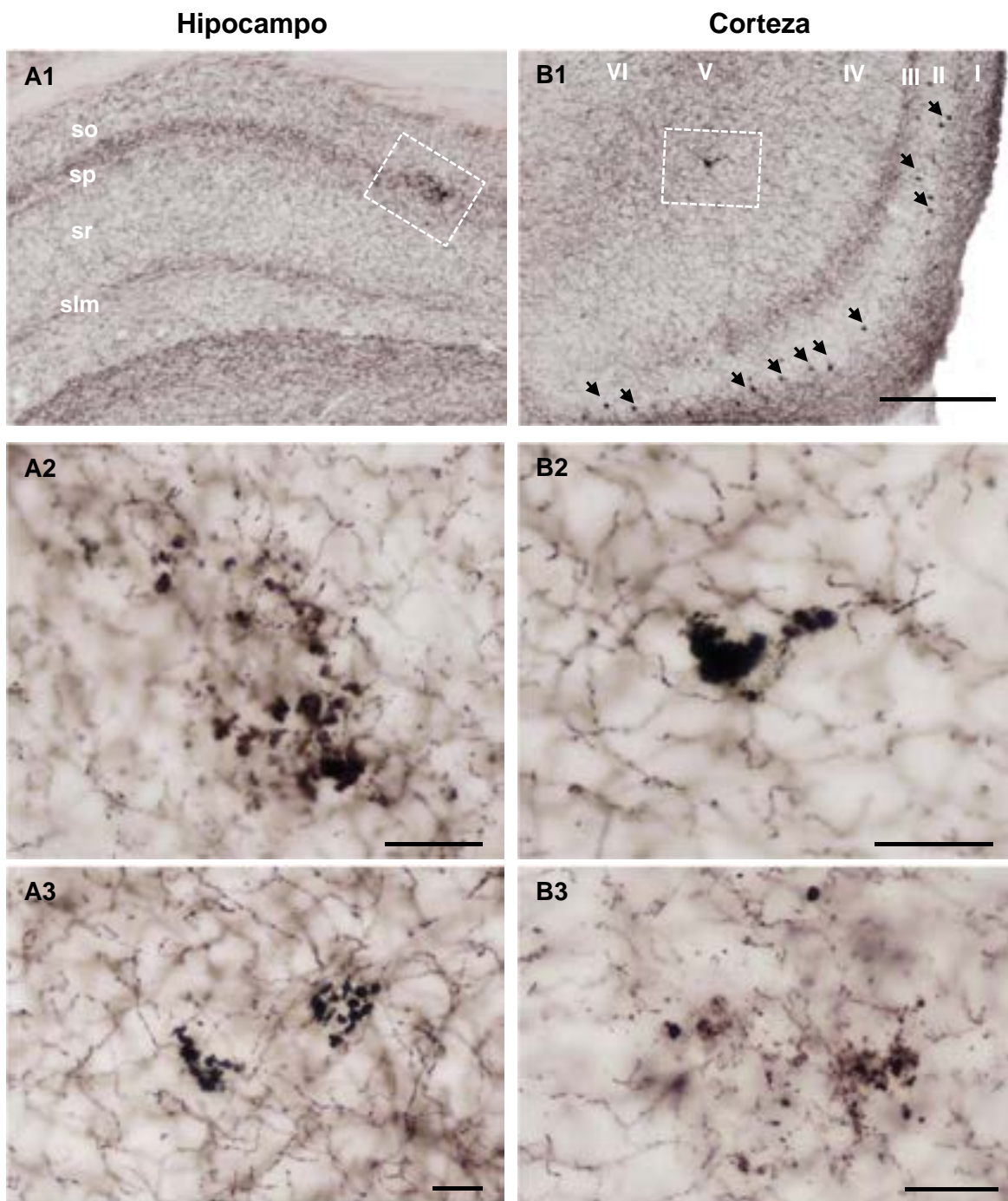


Figura 3.2.16. Los ratones PS1 muestran distrofias ChAT-positivas en el hipocampo y la corteza a los 12 meses de edad. Se encontraron neuritas distróficas positivas para ChAT en los ratones tg PS1 a pesar de la carencia de placas de Abeta. Sin embargo, el número de distrofias fue considerablemente más bajo que en animales con patología amiloide (APP y PS1/APP) y aparecieron a una edad más avanzada. Barras de escala: A1-B1, 200 μm ; A2-B3, 25 μm . so: *stratum oriens*; sp: *stratum pyramidale*; sr: *stratum radiatum*; slm: *stratum lacunosum-moleculare*.

3.2.4. Progresión temporal de la patología amiloide del telencéfalo basal

La(s) causa(s) que provoca(n) la muerte neuronal de las células colinérgicas del telencéfalo basal aún no se conocen, aunque se ha sugerido en múltiples estudios que el principal agente causal de los procesos neurodegenerativos que se dan en la patogenia de la EA es la toxicidad del péptido A β .

Las células colinérgicas del *septum* medial no sobreexpresan el APP humano mutado en los animales PS1/APP (la expresión del transgén humano está dirigida por el promotor Thy1, característico de células glutamatérgicas), como se observa en la doble inmunofluorescencia para ChAT y APP (Fig. 3.2.17A-B). No existe una colocalización entre ambos marcadores en los animales PS1/APP a los 4 meses de edad. Se observaron neuritas distróficas positivas para APP en el *septum* aunque no son de naturaleza colinérgica. Se comprobó además, la ausencia de acumulación intracelular de A β 42 en los somas de las células colinérgicas del *septum* medial (Fig. 3.2.17C-D).

La acumulación extracelular de A β en forma de placas en los núcleos del telencéfalo basal comienza a edades avanzadas. En el NBM (Fig. 3.2.18), las primeras placas de A β aparecen a los 6 meses de edad (Fig. 3.2.18A), incrementándose en número con la edad (Fig. 3.2.18B). En el complejo formado por el *septum* medial y el núcleo vertical de la banda diagonal de Broca (Fig. 3.2.19), la deposición de A β es, prácticamente, inexistente a los 12 meses de edad, observándose solo una leve inmunotinción difusa.

La aparición de placas de A β en el telencéfalo basal de los animales PS1/APP lleva asociada una activación de células gliales (astroglía y microglía) en dichos núcleos (Fig. 3.2.20). Así, las imágenes obtenidas mediante microscopía de campo claro para la inmunohistoquímica del marcador astroglial GFAP, con una contratinción con rojo congo para las placas de Abeta, mostró la presencia de astrocitos reactivos en el SM y NBM de animales PS1/APP a los 12 meses (Fig. 3.2.20A y Fig. 3.2.20B). En cuanto a la activación microglial, la inmunohistoquímica para Iba1 con contratinción con rojo congo reveló una escasa activación microglial de acuerdo con la escasa o nula presencia de placas de Abeta en el SM de animales PS1/APP de 12 meses (Fig. 3.2.20C). En cuanto al NBM, que si presenta placas de A β a los 12 meses de edad en los animales PS1/APP, se observó activación microglial alrededor de éstos depósitos (Fig 3.2.20D).

3.2.5. Vulnerabilidad de interneuronas colinérgicas de la corteza cerebral

Estudios inmunohistoquímicos han mostrado resultados inconsistentes en relación con la existencia de neuronas colinérgicas en la corteza cerebral de varias especies. Algunos investigadores, no han encontrado neuronas ChAT-positivas en la corteza cerebral de ratas (Armstrong y col., 1983), mientras que otros si hallaron neuronas bipolares en las capas II y III (Avendaño y col., 1996). La presencia de interneuronas colinérgicas en la corteza cerebral de roedores podría proporcionar hasta el 30% de la inervación colinérgica

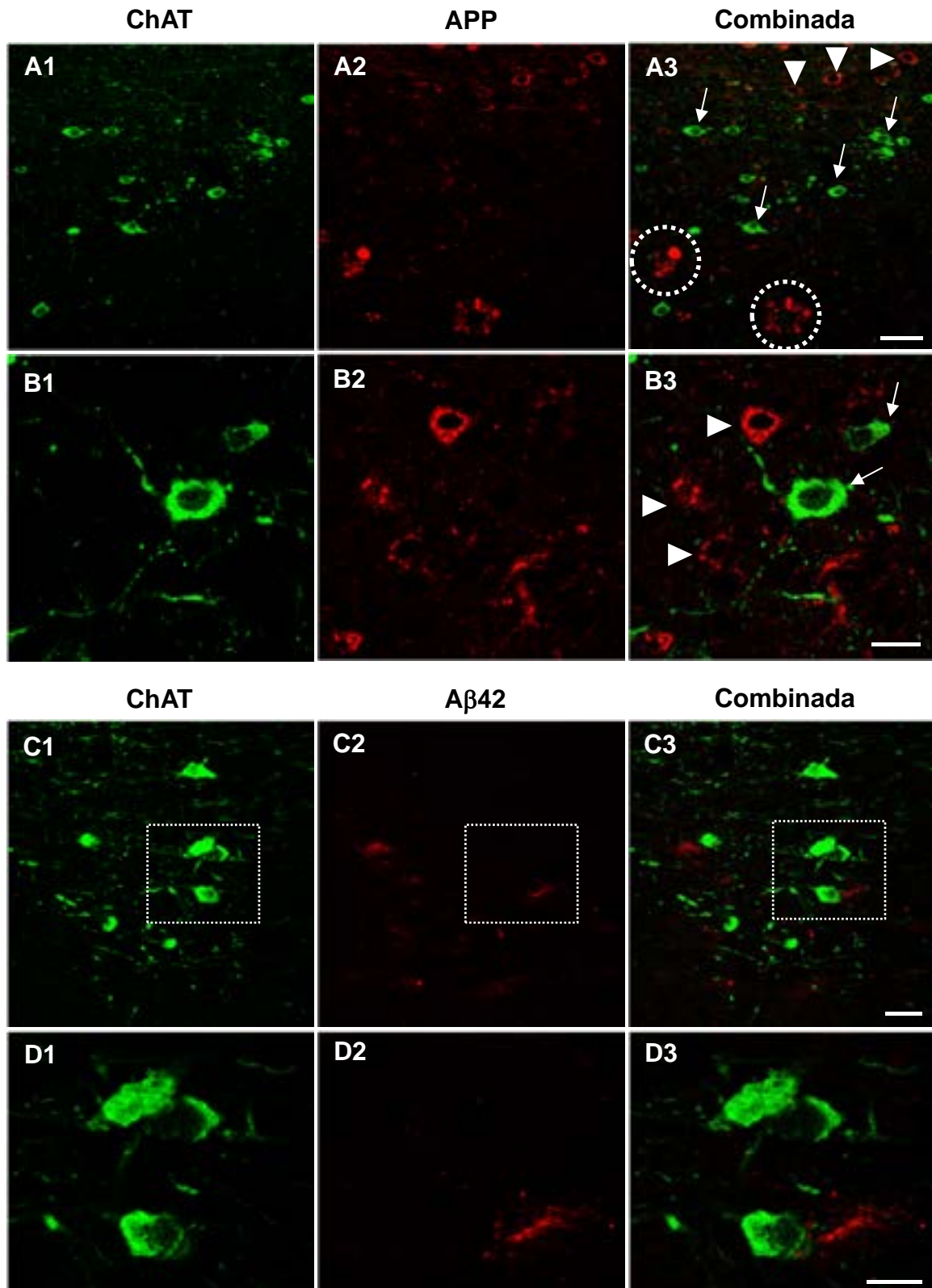


Figura 3.2.17. Las células colinérgicas del telencéfalo basal no expresan hAPP en los ratones PS1/APP ni acumulan Aβ intracelular. Inmunofluorescencia doble a microscopía confocal en el *septum* medial de animales PS1/APP. No se detectó colocalización entre APP y ChAT (A-B). En el *septum* medial se observan distrofias positivas para APP (rodeadas por círculos). Las células colinérgicas del *septum* medial no acumulan Aβ intracelular (C-D). Barras de escala: A, 40 μm; B y D 10 μm; C, 20 μm.

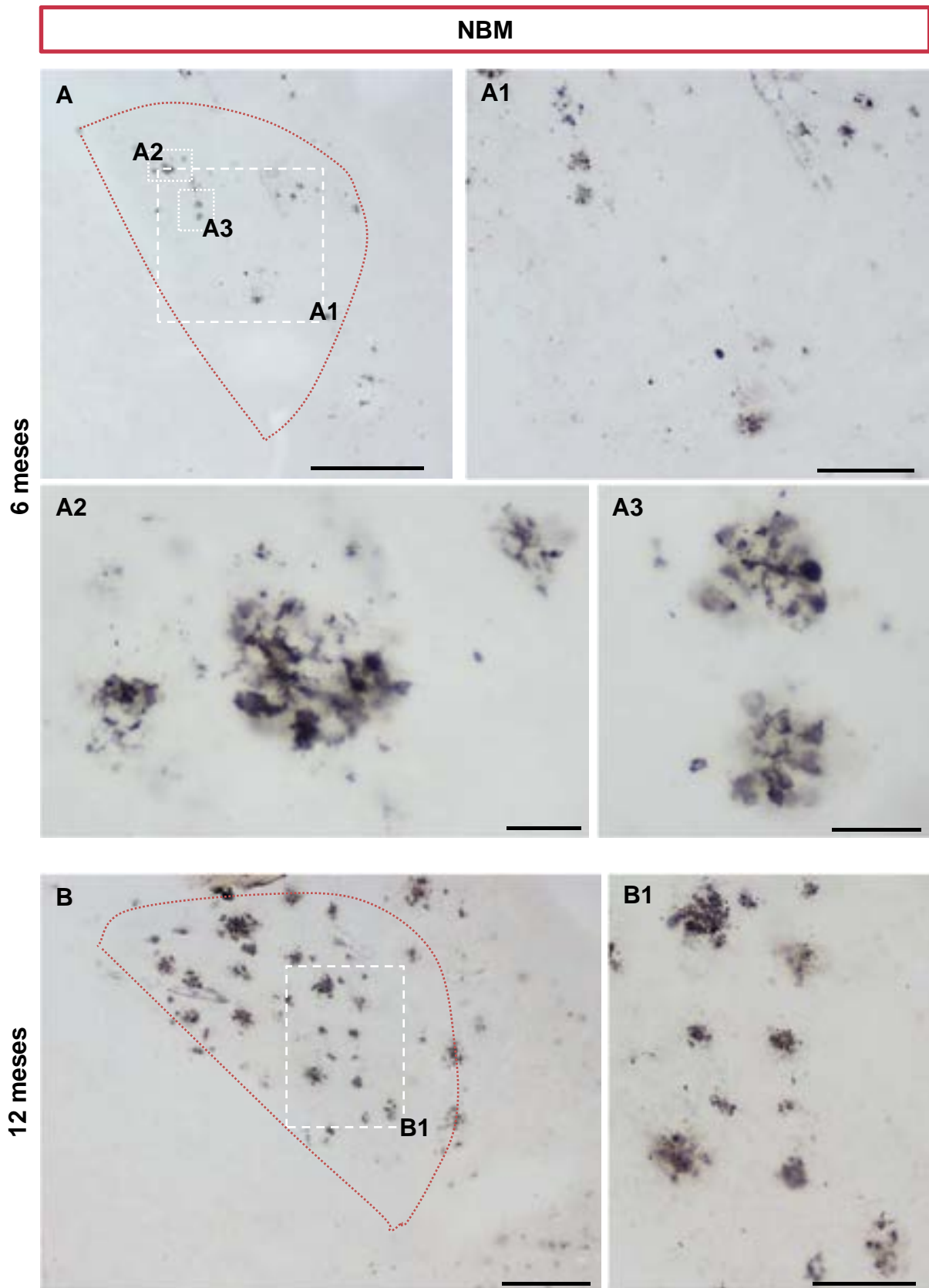


Figura 3.2.18. Placas amiloides en el NBM de animales PS1/APP. La deposición amiloide en el NBM (contorneado en rojo) empieza a los 6 meses (A) e incrementa con la edad (B). Barras de escala: A-B, 500 μm ; A1-B1, 200 μm ; A2-A3, 25 μm .

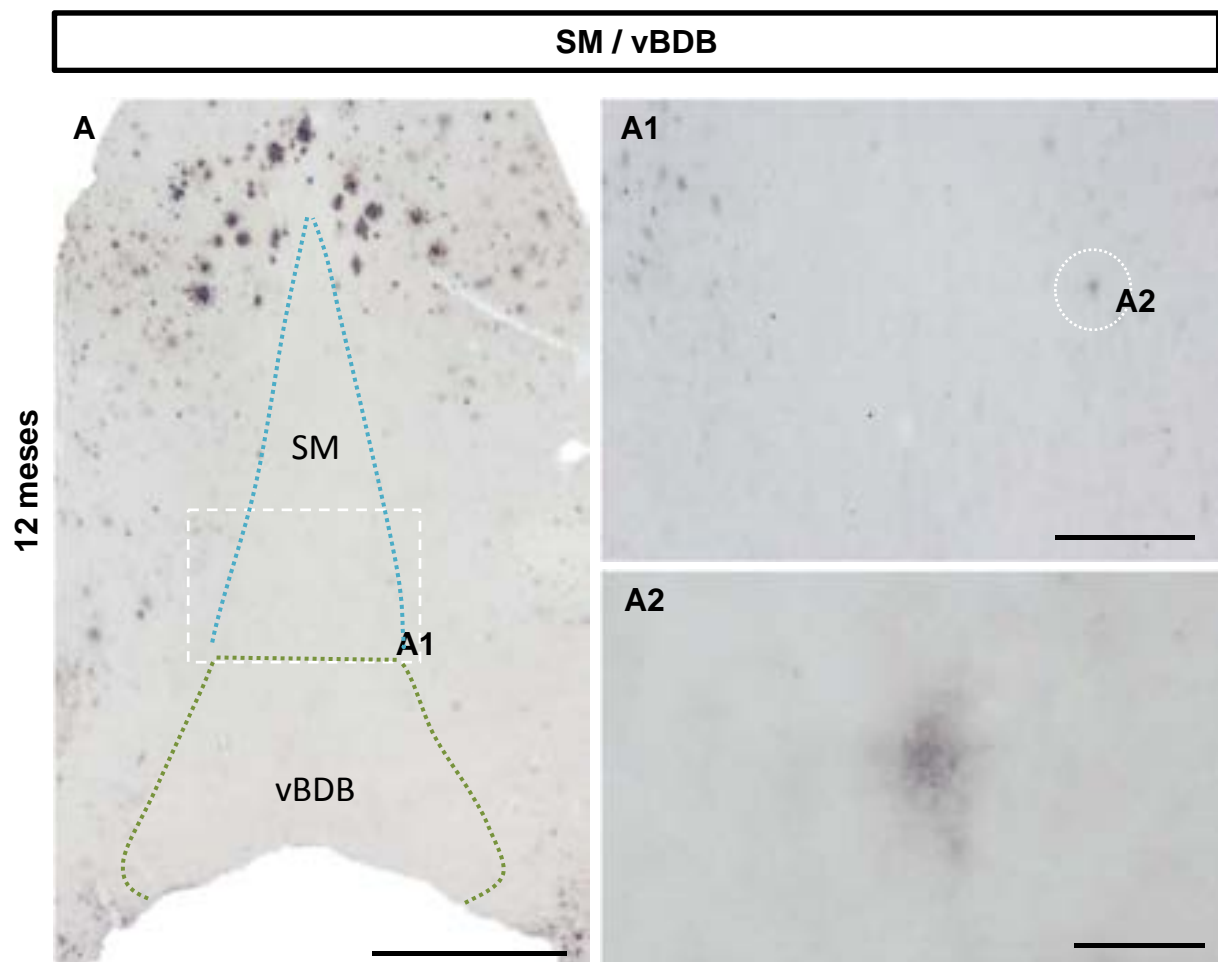


Figura 3.2.19. Placas amiloides en el SM y vBDB de animales PS1/APP. A los 12 meses de edad, no se detecta apenas patología amiloide extracelular en estos núcleos telencefálicos, solo en ocasiones una pequeña inmunoreactividad difusa para Abeta Barras de escala: A, 1000 μm ; A1, 200 μm ; A2, 25 μm .

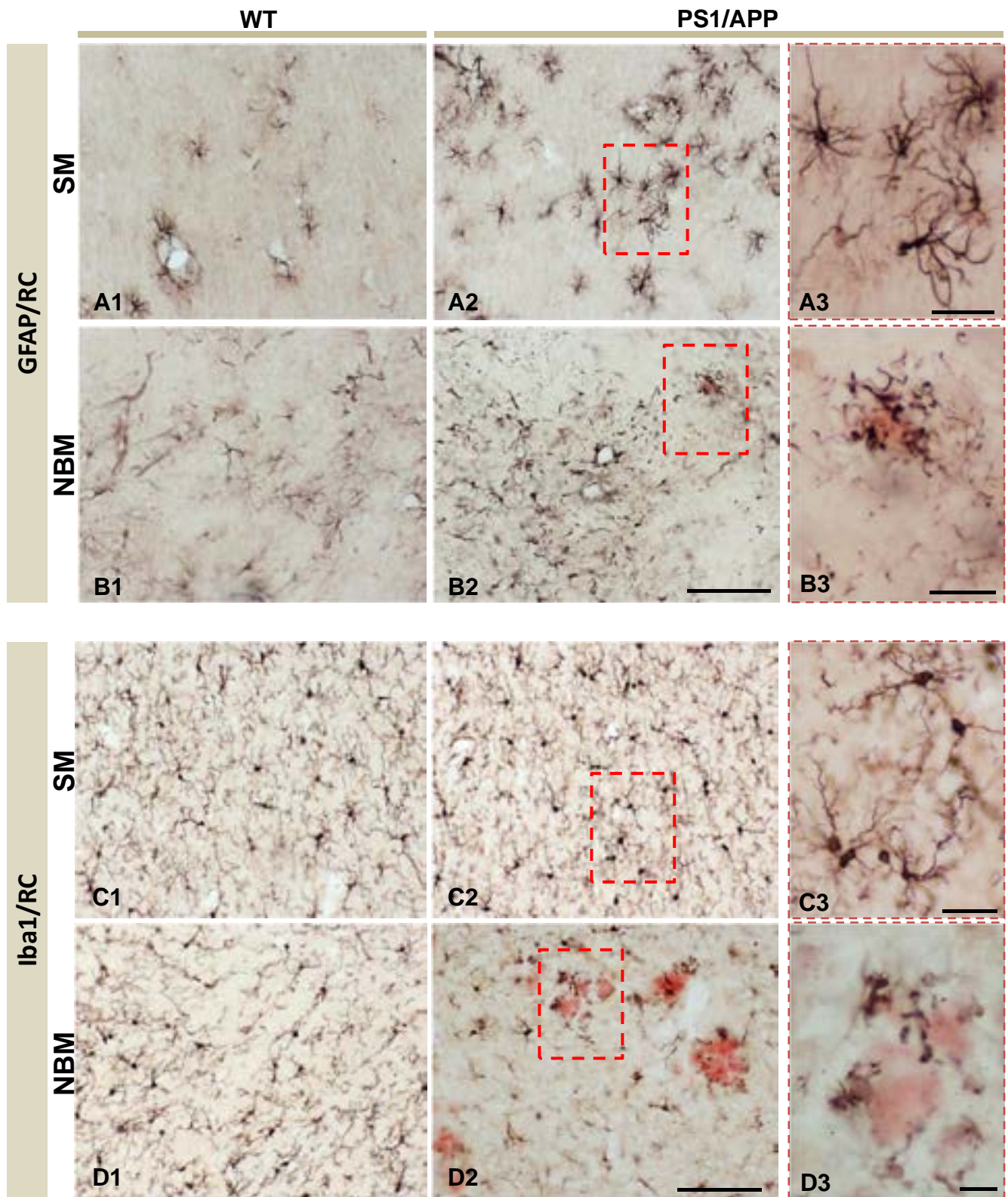


Figura 3.2.20. Activación glial en el telencéfalo basal de animales PS1/APP de 12 meses de edad. Inmunohistoquímica para GFAP (astroglía) y contratinción con rojo congo (A-B) en el *septum* medial (A) y el NBM (B) de animales WT y PS1/APP de 12 meses de edad. C-D) Inmunohistoquímica para Iba1 con contratinción con rojo congo en el SM (C) y NBM (D) de WT y PS1/APP de 12 meses de edad. Barras de escala: 25 μ m.

local (Mesulam, 2004); sin embargo, esta población de interneuronas corticales no ha sido consistentemente demostrada en humanos, por lo que su relevancia en la patología humana es cuestionable. No obstante, en humanos, Kasashima y col. (1999) observaron neuronas positivas para ChAT localizadas en las capas III-V de la corteza, principalmente en áreas corticales motoras y sensoriales secundarias. En las cortezas motora, cingulada y sensoriales, se han descrito interneuronas ChAT positivas bipolares, principalmente, que en las cortezas motora y cingulada estaban localizadas principalmente en las capa II-III, mientras que en las cortezas sensitivas se localizaban las capas II a VI. A pesar de las controversias, decidimos analizar si ésta población era vulnerable en los animales PS1/APP (Fig. 3.2.21). Se analizaron las cortezas retrosplenial granular (RSG) y visual primaria (V1). En los animales PS1/APP destaca la presencia de neuritas distróficas positivas para ChAT a los 12 meses de edad (detalles en Fig. 3.2.21C1-C3), que no se detectaron en los animales WT en ninguna de las cortezas analizadas. El número de somas ChAT-positivos pareció ser menor en los animales transgénicos (inserto en Fig. 3.2.21A2).

Para determinar si, efectivamente, se producía una pérdida de interneuronas ChAT en la corteza, se analizó, mediante estereología, la densidad numérica de células ChAT-positivas (Fig. 3.2.22A-B; tamaño del *frame*: 926,39 μm^2 ; 40% área escaneada) en la RSG (Fig. 3.2.22A) y en la V1 (Fig. 3.2.22B). Esta cuantificación reveló una disminución en el número de células/ mm^3 en la corteza visual primaria ($-49,09 \pm 3,21\%$ en los animales PS1/APP con respecto a los WT) a los 12 meses de edad ($n=4$, 4 secciones/animal; t-test Mann-Whitney, $***p < 0,001$), no obteniéndose diferencias significativas entre los animales WT y PS1/APP en la corteza retrosplenial granular (aunque si se aprecia una tendencia). Esta reducción de la densidad de la población neuronal ChAT-positiva en estas regiones corticales fue corroborada mediante el análisis por RT-PCR de la expresión de ARNm para ChAT en muestras de corteza cerebral (Fig. 3.2.22C), obteniéndose una disminución significativa en ésta en los animales PS1/APP a partir de los 12 meses de edad ($n=4$; ADEVA de 1 vía, *post-hoc* de Tukey, $*p < 0,05$).

3.2.6. Estudio de los déficits cognitivos en modelos transgénicos de la EA. Correlación con la pérdida de neuronas colinérgicas. Prueba de reconocimiento de objetos.

Con la idea de conocer si la pérdida de neuronas colinérgicas que tiene lugar en los núcleos del telencéfalo basal, y que proyectan a corteza e hipocampo, en los modelos animales PS1/APP y PS1 a los 12 meses de edad se manifiesta con disfunción cognitiva a esta edad, realizamos un análisis del aprendizaje-memoria empleando una prueba de reconocimiento de objetos (Fig. 3.2.23). Para ello se utilizaron ratones macho WT, PS1/APP y PS1 ($n=6-8$ por grupo) de 12 meses de edad. Todo el procedimiento experimental tuvo lugar durante la primera y sexta hora de la fase de luz y fue llevado a cabo por un experimentador “ciego” al genotipo del animal.

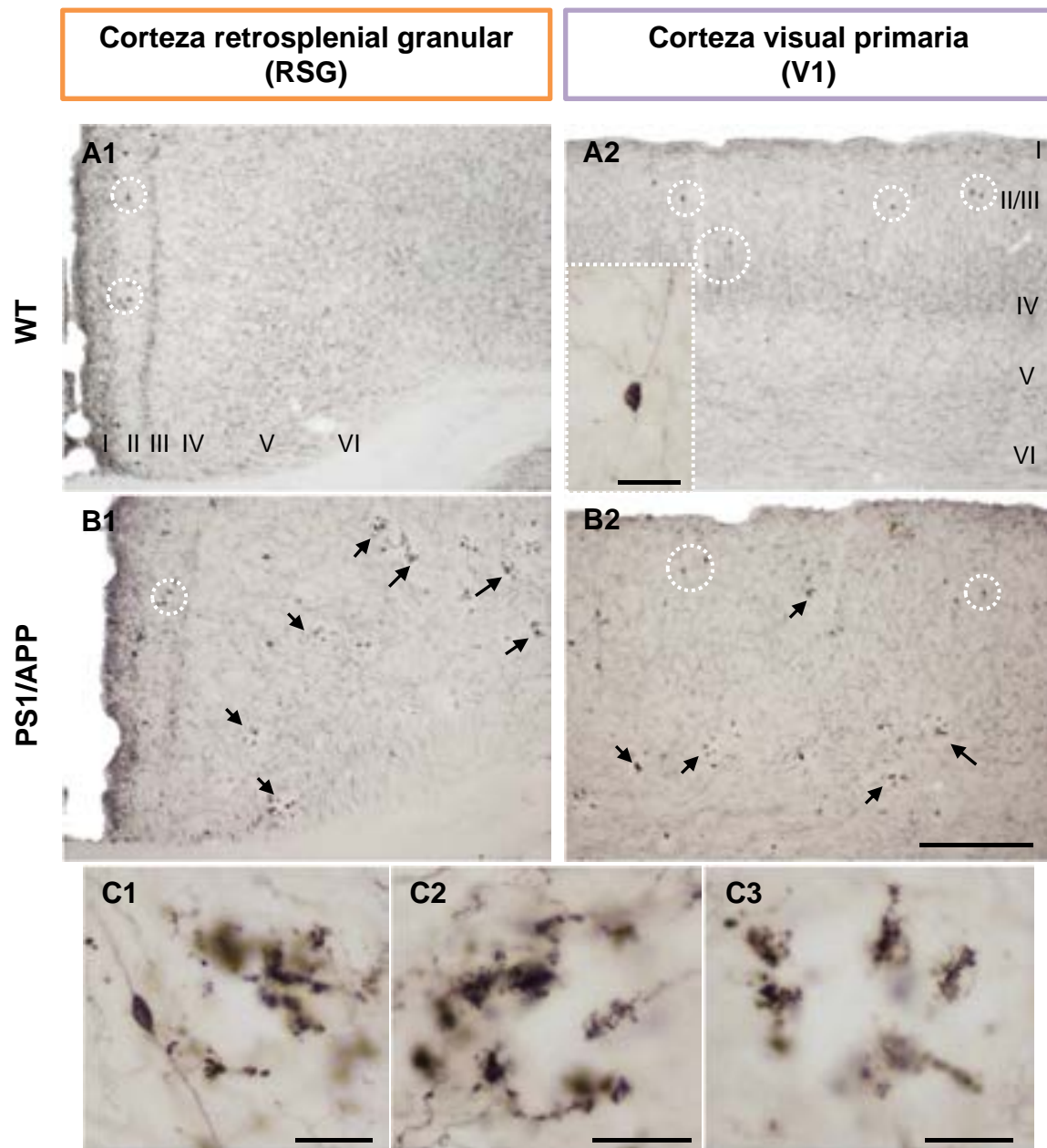


Figura 3.2.21. Interneuronas y distrofias axonales ChAT-positivas en la corteza cerebral de ratones transgénicos PS1/APP. Se observó una reducción en el número de interneuronas ChAT (indicadas en círculos en A y B; inserto en A2) en los animales PS1/APP (B1-B2) en comparación con los animales WT (A1-A2). Las neuritas distróficas positivas para ChAT (flechas negras) en las cortezas RSG (B1) y V1 (B2) se observaron sólo en los animales transgénicos (para detalles ver C1-C3). I-VI: capas corticales. Barras de escala: A y B, 200 μ m; C, 25 μ m.

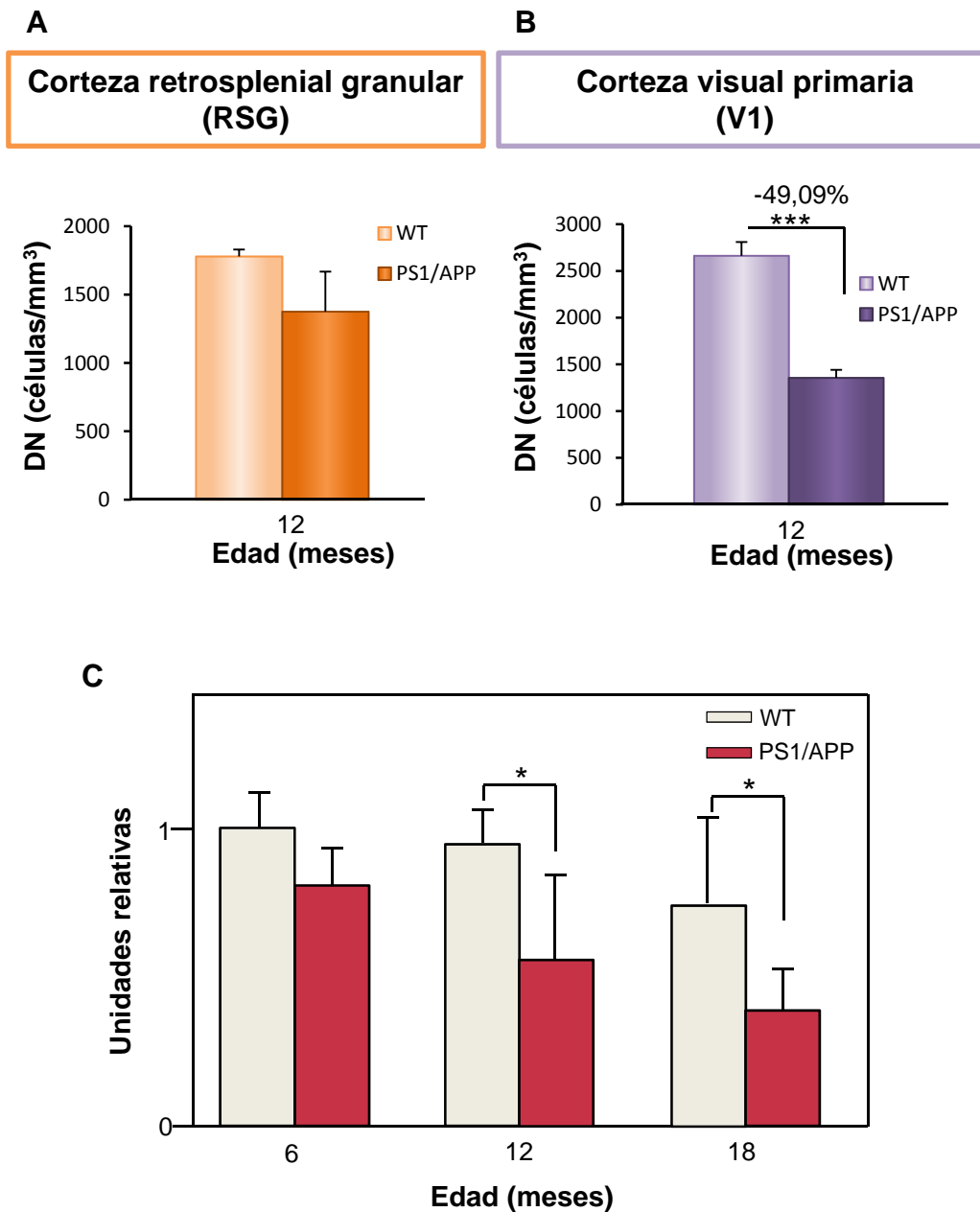


Figura 3.2.22. Reducción de interneuronas positivas para ChAT en la corteza visual primaria (V1) de animales PS1/APP a los 12 meses de edad. Una reducción en el número de células ChAT se detectó en la corteza visual primaria (B) de animales PS1/APP ($-49,09 \pm 3,21\%$) en comparación con los WT a los 12 meses de edad. No se detectaron cambios en la corteza RSG (A). C) La cuantificación de los niveles de expresión, mediante RT-PCR, de la enzima ChAT en la corteza de animales WT y PS1/APP muestra una reducción significativa a partir de los 12 meses de edad en los animales transgénicos. Datos representados por la media \pm SD. A y B) t-test Mann-Whitney; C) ADEVA de 1 vía ($F=(5,46)=9,51$, $p=0,00001$). *** $p<0,001$, * $p<0,05$. $n=4$ por grupo, 4 secciones por animal.

Esta prueba se fundamenta en la tendencia natural de los ratones a explorar nuevos objetos y ambientes y compararlos con otros que les son familiares (Navarrete y col., 2008). Para llevar a cabo la prueba, se expone al ratón a una serie de objetos y se espera a que los exploren, midiendo el tiempo de exploración (período durante el cual el animal olisquea o toca el objeto con las patas delanteras a una distancia menor o igual a 1 cm). Tras la correspondiente manipulación y habituación de los animales al experimentador y al entorno, se lleva a cabo el experimento. El diseño experimental se muestra en la Fig. 3.2.23A. En este caso, se ha utilizado un protocolo modificado (Davis y col., 2013) basado en la preferencia por el “objeto familiar viejo” sobre el “objeto familiar reciente” y la preferencia por una nueva localización. 60 minutos después de la habituación al *open-field*, los animales se expusieron, en primer lugar, a 4 objetos idénticos (triángulos en el esquema) colocados en una configuración en forma de triángulo y se les permitió explorarlos durante 10 minutos (muestra 1). Tras dos horas, los ratones se expusieron a una segunda muestra con 4 objetos idénticos entre sí (estrellas en el esquema) pero diferentes a los anteriores. La prueba (test) se inició dos horas después y durante 10 minutos. En esta prueba, dos objetos de ambas muestras 1 y 2 (objetos “viejo familiar” y “reciente familiar”, respectivamente) se colocaron en una configuración en forma de cuadrado, de manera que, un objeto viejo y uno reciente estaban presentes en una posición familiar (viejo-estático y reciente-estático), mientras que los otros dos estaban desplazados a una nueva posición (viejo-desplazado y reciente-desplazado). La prueba se realiza en un campo abierto que situamos en una habitación homogéneamente iluminada.

Se calcularon dos índices de discriminación de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$\text{Ratio de reconocimiento de objeto} = \frac{\text{Tiempo total explorando el objeto "viejo familiar"}}{\text{Tiempo total de exploración}}$$

$$\text{Ratio de reconocimiento de lugar} = \frac{\text{Tiempo total explorando el objeto desplazado}}{\text{Tiempo total de exploración}}$$

Se observaron diferencias significativas en los índices de discriminación, tanto en ratio de reconocimiento de objeto (Fig. 3.2.23B) como en la de lugar (Fig. 3.2.23C) en los animales transgénicos PS1 y PS1/APP (n=6-8 por grupo; ADEVA de 1 vía, *post-hoc* de Newman-Keuls, **p<0,01, *p<0,05) respecto a los controles WT de la misma edad. Estos datos demuestran la existencia de déficits cognitivos a los 12 meses de edad en estos modelos animales, que podrían estar asociados, al menos en parte, con la patología colinérgica.

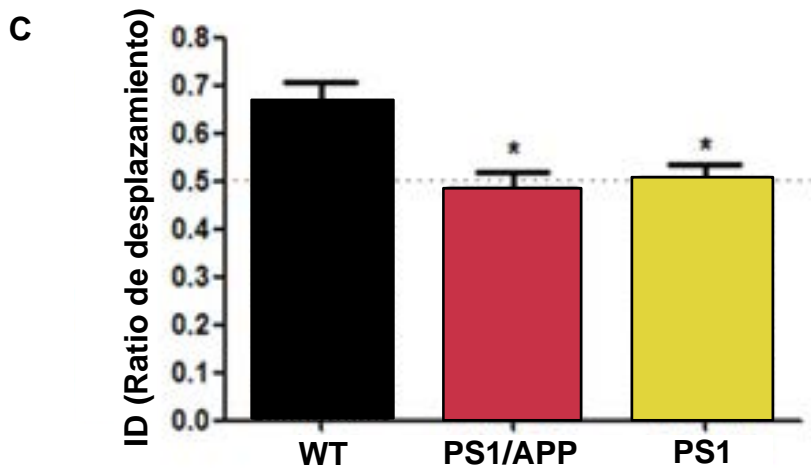
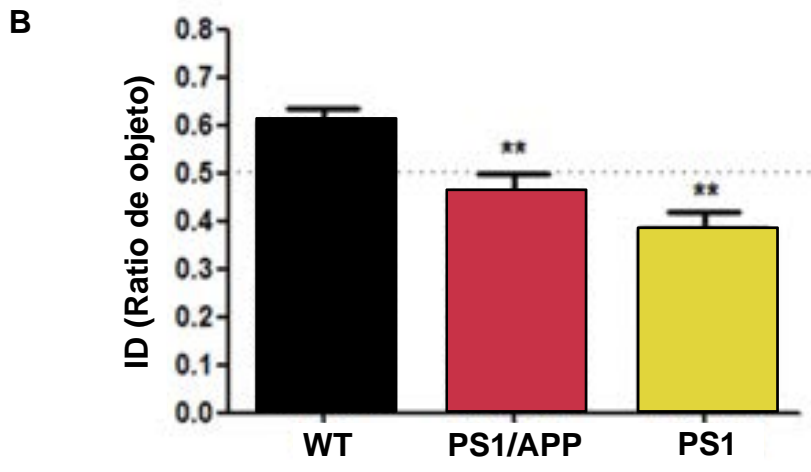
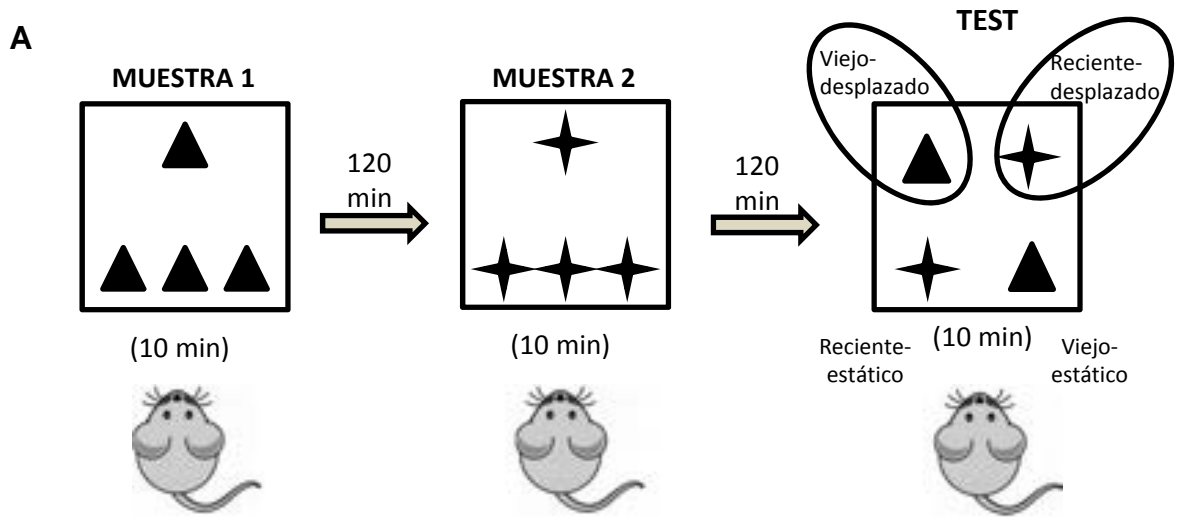


Figura 3.2.23. Déficits de comportamiento en animales transgénicos PS1/APP y PS1 de 12 meses de edad. A) Protocolo de la prueba de reconocimiento de objetos. Los animales realizaron tres ensayos con muestras con un tiempo inter-prueba de 120 min. Cada símbolo (triángulo y estrella) representa uno de los tipos de objetos. Se detectaron diferencias significativas entre los animales PS1/APP y PS1 en comparación con los WT de la misma edad en el índice de reconocimiento de objeto (B) y en el índice de memoria de lugar (C). Los datos se representan mediante la media±SEM y se analizaron por un ADEVA DE 1 VÍA B) $F(2,18)=9,961$, $p=0,0012$; para C) $F(2,15)=4,241$, $p=0,0347$; *post hoc* Newman-Keuls. ** $p<0,01$, * $p<0,05$. $n=6-8$ por grupo.

DISCUSIÓN

Este estudio ha demostrado que hay pérdida significativa de la población colinérgica (neuronas/mm³) en los principales núcleos del telencéfalo basal (núcleo basal de Meynert, *septum* medial y núcleo vertical de la banda diagonal de Broca), así como degeneración axonal/sináptica en las regiones dianas de las proyecciones colinérgicas (hipocampo y corteza cerebral) en varios modelos transgénicos (PS1/APP, PS1 y TAU), excepto en el modelo monogénico APP. Esta degeneración del sistema colinérgico, similar a lo que ocurre en pacientes, valida el uso de estos modelos para su uso preclínico en la evaluación de nuevos compuestos terapéuticos dirigidos a prevenir la muerte neuronal y/o restablecer la señalización colinérgica.

La alteración del sistema colinérgico en el lóbulo temporal medial es un evento temprano en pacientes de Alzheimer (Perry y col., 1981; Bowen y col., 1982), donde se ha descrito una pérdida de fibras, terminales y receptores. Hacia el final de la enfermedad, casi el 95% de las células colinérgicas del BF degeneran (Mesulam y col., 2004). Además, en individuos con deterioro cognitivo leve (MCI) y demencia, se produce una reducción en el volumen de diferentes núcleos colinérgicos como el NBM (Teipel y col., 2011; Kilimann y col., 2014). También, se ha observado una reducción de las actividades de las enzimas ChAT y AChE (Coyle y col., 1983; Gil-Bea y col., 2005). Funcionalmente, la pérdida cortical e hipocampal de actividad ChAT y de neuronas colinérgicas del BF correlaciona mejor, que las placas y ovillos, con la demencia clínica en la EA (Wilcock y col., 1982; Dekosky y col., 1992; Ramos-Rodriguez y col., 2013). Esta relación entre la transmisión colinérgica y los daños cognitivos está apoyada por el efecto de los tratamientos farmacológicos colinérgicos en la memoria de trabajo y la atención (Ellis y col., 2006).

Debido, por tanto, a la afectación selectiva del sistema colinérgico durante el desarrollo de la EA, decidimos evaluar esta población en nuestro modelo animal PS1/APP de la enfermedad y en otros modelos transgénicos (PS1, APP, PS1d9/APP y TAU), ya que, actualmente se desconoce cuál es la principal causa de la degeneración del sistema colinérgico, aunque se ha propuesto que los núcleos colinérgicos son particularmente vulnerables a la patología neurofibrilar y a la acumulación de A β intracelular (Sassin y col., 2000; Mesulam y col., 2004; Geula y col., 2008; Baker-Nigh y col., 2015).

Clásicamente ha prevalecido la hipótesis neurotrófica para explicar la disfunción colinérgica en la EA, que implica una desregulación de la señalización trófica como una de las causas primarias de la degeneración (Counts y Mufson, 2005), ya que las células colinérgicas dependen del factor de crecimiento nervioso (NGF) para su supervivencia. Este factor de crecimiento, sintetizado y secretado por las células de la corteza y el hipocampo, tiene dos receptores, ambos presentes en las células colinérgicas, uno de alta afinidad (TrkA, del inglés *tropomyosin-related kinase A*) y otro de baja afinidad (p75^{NTR}).

La disfunción de NGF y sus receptores se ha propuesto como causa de la degeneración selectiva de neuronas colinérgicas del BF en la EA (Niewidomska y col., 2011). De hecho, análisis cuantitativos han mostrado una reducción significativa en la expresión del receptor TrkA en el telencéfalo basal de pacientes de Alzheimer (Mufson y col., 2000b). Sin embargo, los niveles del receptor de neurotrofinas de baja afinidad p75 permanece sin cambios (Ginsberg y col., 2006). Este último, además de las funciones tróficas, tiene capacidad apoptótica y de unión a β -amiloide (Knowles y col., 2009). En relación con esta hipótesis, se ha especulado que la patología de la EA comienza en la corteza cerebral y se extiende a núcleos subcorticales vía proyecciones axonales de éstos a la corteza, por medio del transporte retrógrado del $A\beta$ (Yankner, 1996) o por la pérdida del transporte de uno o más factores neurotróficos (Mufson y col., 1995). De hecho, en el modelo Thy1-hAPP-London/Swe en el que se elimina el receptor p75, se produce una ausencia completa de las distrofias colinérgicas corticales inducidas por $A\beta$, indicando la relevancia de este receptor en el proceso neurodegenerativo (Ovsepian y Herms, 2013).

La pérdida de neuronas colinérgicas en los modelos PS1/APP, PS1 y TAU, y no así en el modelo APP (al menos hasta los 12 meses de edad), indica una posible relación causal con las mutaciones en los genes *PS1* y *TAU* (patología Tau), indicando una implicación de estas proteínas mutadas en la neurodegeneración del sistema colinérgico (ver más adelante). Además, en los modelos PS1/APP, PS1 y TAU hemos detectado una reducción significativa de fibras ChAT-positivas en el hipocampo. Consistente con esta reducción, se ha descrito una disminución de la densidad de fibras colinérgicas en tejido *post mortem* de pacientes de la EA (Wu y Xie, 2006) que se ha correlacionado con la disfunción cognitiva (Billings y col., 2005).

Sin embargo, se ha relacionado el sistema colinérgico con el péptido amiloide. La primera evidencia de esta relación fue la presencia de la enzima AChE en los depósitos amiloides (Mesulam, 1986; Moran y col., 1993), habiéndose demostrado que esta enzima acelera el ensamblaje del $A\beta$ en forma de fibrillas insolubles (Inestrosa y col., 1996). Por otro lado, parece que la estimulación de receptores muscarínicos de ACh incrementa el procesamiento no amiloidogénico del APP, disminuyendo la producción de $A\beta$ (Nitsch y col., 1992; Seo y col., 2002), y que la pérdida de inervación colinérgica cortical conduce a un incremento en la deposición amiloide en animales *wild-type* (Beach, 2008) y en el modelo PS1d9/APP (Ramos-Rodriguez y col., 2013). Por tanto, parece que la disfunción del sistema colinérgico puede influir en la amiloidosis cerebral. Por el contrario, se ha propuesto que el $A\beta$ puede contribuir a la vulnerabilidad colinérgica (Pettit y col., 2001; Meyer-Luehmann y col., 2008; Ramos-Rodriguez y col., 2013), induciendo cambios neurodegenerativos en los terminales colinérgicos (Selkoe, 2002; Schliebs y Arendt, 2006). En este sentido se ha descrito que el $A\beta$ soluble, a bajas concentraciones, compromete la función colinérgica (Liu y col., 2001; Pettit y col., 2001; Nagele y col., 2002). No obstante,

este efecto no conlleva necesariamente neurodegeneración, ya que, por ejemplo, el A β 42 suprime la síntesis de ACh sin aparente neurotoxicidad (Hoshi y col., 1997), lo que concuerda con nuestros datos que demuestran la ausencia de pérdida neuronal colinérgica en un modelo transgénico que sobreexpresa APP. Por ello, aún hoy, todavía está bajo debate si la pérdida y degeneración de terminales colinérgicos es un evento primario o secundario a la deposición amiloide, quedando por dilucidar la relación entre la amiloidosis cerebral y la alteración colinérgica en la EA (Geula y col., 1998).

No obstante, la deposición amiloide parece tener un importante impacto sobre los axones colinérgicos, ya que se desarrollan abundantes neuritas distróficas ChAT-positivas en los animales transgénicos que portan mutaciones en *APP* (PS1/APP y APP). De hecho, un incremento en la carga amiloide se ha asociado con la degeneración de axones colinérgicos (Yan y Feng, 2004), aunque otros estudios no han mostrado esta relación directa entre la alteración colinérgica y la deposición del A β . Así, Stokin y col. (2005) mostraron que las distrofias axonales colinérgicas precedían a la formación de placas en el modelo APP^{swe}, sugiriendo que su presencia estaba relacionada con un déficit en el transporte axonal y no con la deposición amiloide (Pigino y col., 2003). A favor de esto, está el hecho de que, en el modelo Tg2576 se ha hallado una reducción en los niveles hipocampales y corticales del receptor muscarínico M1 de ACh a los 8 meses de edad, cuando todavía no hay acumulación de A β (Apelt y col., 2002). Esto podría explicar la presencia de distrofias ChAT-positivas en el modelo transgénico PS1_{M146L} descrita aquí, ya que la deposición del péptido amiloide es un evento secundario a la afectación del sistema colinérgico. Sin embargo, se ha descrito que las mutaciones en *PS1* provocan un incremento en la relación A β 42/A β 40 (Borchelt y col., 1996; Duff y col., 1996; Jankowsky y col., 2004), siendo el A β 42 el más tóxico. Por tanto, no podemos descartar este efecto. De hecho, las mutaciones en *PS1* incrementan las distrofias neuríticas en neuronas que son expuestas a A β (Pigino y col., 2001), explicando por qué las distrofias son más abundantes en los modelos transgénicos que sobreexpresan *APP*.

La patología distrófica es claramente mayor en los animales que sobreexpresan el gen *APP* mutado, PS1/APP y APP, que muestran una sobreproducción del péptido amiloide y la formación de placas, por lo que el A β , a nivel local (en las regiones diana de las células colinérgicas del BF) provoca una degeneración de los terminales colinérgicos con la aparición de neuritas distróficas. De hecho, se ha descrito una reducción de fibras y terminales colinérgicos en diferentes modelos APP (German y col., 2003; Lüth y col., 2003). El análisis ultraestructural de distrofias en los animales PS1d9/APP y otros modelos que sobreexpresan APP reveló la presencia de vesículas (Lüth y col., 2003) que son parte del sistema lisosomal implicado en mecanismos endocíticos (Cataldo y col., 2004) y/o autofágicos (Wang y col., 2006). Aquí, hemos mostrado la acumulación de vesículas autofágicas (LC3b positivas), lisosomas y Tau hiperfosforilada, en las distrofias

colinérgicas localizadas en el hipocampo de animales PS1/APP. Sin embargo, el papel del A β sobre la población colinérgica queda aún por dilucidar.

Por tanto, y aunque no podemos descartar un efecto del A β a nivel local sobre los terminales colinérgicos que conduce a la formación de neuritas distróficas positivas para ChAT, sí que podemos confirmar que la degeneración de neuronas colinérgicas en los diferentes núcleos del telencéfalo basal no es debida a la acumulación extracelular de amiloide. En primer lugar, la presencia de placas en los distintos núcleos, en el modelo PS1/APP, es muy tardía. De hecho, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos en muestras *post mortem* de pacientes de Alzheimer, en las que se ha encontrado que los núcleos colinérgicos del BF contienen pocas placas y en algunos casos incluso no aparecen (Baker-Nigh y col., 2015). Segundo, estudios previos de otros grupos (Bronfman y col., 2000; Apelt y col., 2002), y resultados de este trabajo, han mostrado una ausencia de pérdida de neuronas ChAT en los animales transgénicos APP. Sin embargo, en el modelo TgCRDN8 (Belluci y col., 2006) se ha descrito una pérdida neuronal en el NBM a los 7 meses de edad, y en el modelo APP23 se han obtenido resultados contradictorios (Boncristiano y col., 2002; Diez y col., 2003; Choi y col., 2013). En este trabajo hemos mostrado que en nuestro modelo APP, pese a la presencia de neuritas distróficas ChAT-positivas en las regiones diana, no se producen cambios en la densidad numérica de células colinérgicas en los diferentes núcleos del BF estudiados ni alteración en la densidad de fibras colinérgicas hipocampales; sucesos, ambos, observados en un modelo PS1 y en un modelo TAU. Esto concuerda con el hecho de que la pérdida de neuronas colinérgicas ha sido descrita en otros modelos transgénicos de la EA que portan mutaciones en *PS1* y *TAU*, además de en *APP*, como el APP/PS1_{KI} (Christensen y col., 2010), el 5xFAD (Oakley y col., 2006), el 3xTg-AD (Perez y col., 2011) y el Thy-TAU22 (Belarbi y col., 2011).

Por ello, y a pesar de que el A β puede afectar, por diversos mecanismos al sistema colinérgico (Shearman y col., 1994; Kar y col., 1996; Vaucher y col., 2001), su papel como responsable de los déficits colinérgicos en la EA puede ser cuestionado, y se ha propuesto una interpretación independiente del A β (ver revisión Sorrentino y col., 2014) que podría explicar mejor la degeneración del este sistema durante la progresión de la enfermedad.

En este sentido, y aunque la hipótesis prevalente de la EA es la de la cascada amiloide (Hardy y Selkoe, 2002), pruebas recientes sugieren que la pérdida de función de la Presenilina podría explicar mejor la demencia y la neurodegeneración, habiéndose propuesto la ‘hipótesis de Presenilina de la EA’ (Shen y Kelleher, 2007; Zahs y Ashe, 2015). Esta nueva hipótesis se encuentra apoyada por el hecho de que la inactivación condicional de *PS* en el cerebro adulto de ratón causa pérdida progresiva de memoria y neurodegeneración de manera similar a lo que ocurre en la EA, mientras que los modelos basados en la sobreproducción de A β han fallado en reproducir el proceso neurodegenerativo (Irizarry y col., 1997). Además, se han identificado mutaciones en el

gen *PS1* (L113P, G183V e insR352) en la demencia frontotemporal, que carece de patología amiloide (Amtul y col., 2002; Dernaut y col., 2004).

Como se ha descrito en el Apdo. 1.1.3.2 de la Introducción, las Presenilinas son proteínas integrales de membrana y componentes enzimáticos del complejo γ -secretasa que genera A β . Se ha descrito que las mutaciones en los genes *PS1* y *PS2* incrementan la producción de la forma neurotóxica A β 42 (Hardy, 1997), además estas mutaciones son las más frecuentes en el Alzheimer familiar, constituyendo aproximadamente el 90% de las mutaciones identificadas (Watanabe y col., 2014), pero el mecanismo por el que causan el daño cognitivo característico de la EA no se conoce.

Mientras que los estudios iniciales apoyaban la idea de un mecanismo patogénico debido a una ganancia de función que conllevaba la producción excesiva de A β 42 (Borchelt y col., 1996; Duff y col., 1996; Scheuner y col., 1996), se han encontrado evidencias que ayudan a rechazar esta hipótesis (Fig. 3.2.24), apoyando el papel de la pérdida de función Presenilina (Shen y Kelleher, 2007; Kelleher y Shen, 2010). Por ejemplo, la sobreproducción de A β 42 no produce neurodegeneración significativa en modelos animales murinos (Games y col., 1995; Hsiao y col., 1996, Irizarry y col., 1997; Mucke y col., 2000). Además, los pacientes con mutaciones en *PS* desarrollan la enfermedad a edades más tempranas que los que portan mutaciones en *APP* (Ryman y col., 2014), aunque el incremento en la ratio A β 42/A β 40 sea menor. Por otro lado, las mutaciones del Alzheimer familiar en *PS* causan pérdida de actividad Presenilina en cultivos celulares (Song y col., 1999; Heilig y col., 2010; 2013) y *C. elegans* (Levitan y col., 1996). En este último organismo modelo, las mutaciones en los genes *sel-12* y *hop-1* (homólogos a *PS*) conllevan un defecto en la memoria térmica de estos animales causado por la pérdida de función de Presenilina en las interneuronas AIY, que producen ACh como neurotransmisor y están implicadas en la plasticidad sináptica (Mori y Ohshima, 1995). Estas neuronas muestran defectos en la morfología neurítica en animales que llevan mutaciones en Presenilina (Wittemburg y col., 2000), indicando una relación entre la vulnerabilidad neuronal de las células que producen ACh y las mutaciones en Presenilina. Se ha descrito que, en el cerebro adulto, las Presenilinas juegan un papel esencial en la función sináptica, el aprendizaje, la memoria y la supervivencia neuronal (Yu y col., 2001; Zhang y col., 2009) y durante el desarrollo cerebral ejercen efectos pleiotrópicos que incluyen la regulación de la neurogénesis y de la señalización Notch (Shen y col., 1997; Handler y col., 2000).

La pérdida de Presenilinas en neuronas excitatorias de la corteza cerebral de ratones condicionales *knockout*, recapitula la disfunción sináptica y neurodegeneración dependiente de la edad con hiperfosforilación de Tau (Yu y col., 2001; Beglopoulos y col., 2004; Feng y col., 2004; Saura y col., 2004; Zhang y col., 2009; 2010a; Wines-Samuelson y col., 2010; Wu y col., 2013; Lee y col., 2014; Watanabe y col., 2014), demostrando que

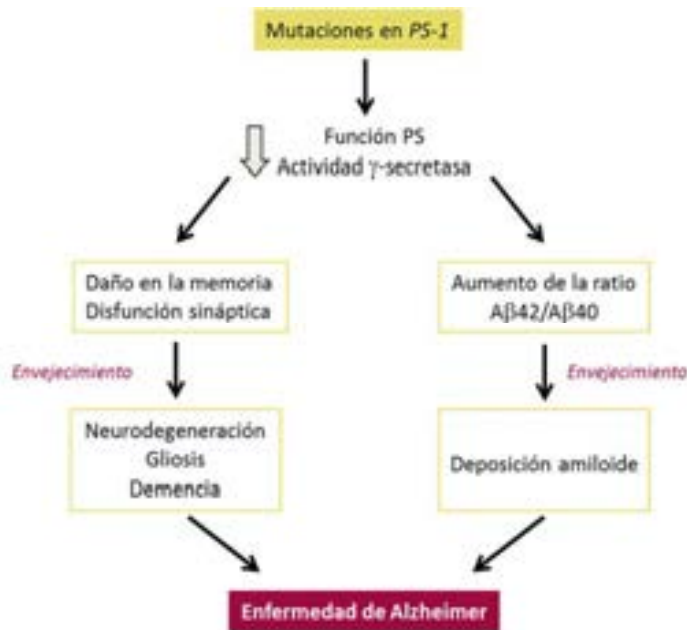


Figura 3.2.24. Proceso degenerativo en la EA familiar con mutaciones en *PS1*. Las mutaciones en *PS1* causan la pérdida de función de la proteína Presenilina-1 y de actividad γ -secretasa, conduciendo a cambios neuropatológicos y funcionales relevantes en la EA, que incluyen daño en la memoria, disfunción sináptica, neurodegeneración, gliosis y demencia. En paralelo a la pérdida de función PS, estas mutaciones también producen un incremento en la ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$, promoviendo la deposición de placas amiloides. Así, las mutaciones en *PS* producen el fenotipo característico de la EA a través de mecanismos de pérdida de función (Modificado de Xia y col., 2015).

estas proteínas son esenciales para la supervivencia neuronal en el cerebro adulto. La neurodegeneración es dependiente de la dosis de Presenilina, ya que en ausencia de *PS1*, *PS2* está sobreexpresada y puede suplir su carencia (Watanabe y col., 2014). Además, la inactivación de otro componente del complejo γ -secretasa, como la Nicastrina (Tabuchi y col., 2009), en el cerebro de ratón adulto, produce neurodegeneración, inflamación e hiperfosforilación de Tau, conduciendo a la propuesta de que las mutaciones en *PS* pueden causar neurodegeneración y demencia en el Alzheimer familiar debido a la pérdida de función de esta proteína y confirmando la importancia de γ -secretasa en la memoria, la función sináptica y la supervivencia neuronal (Tabuchi y col., 2009; Lee y col., 2014). Estos datos explicarían la pérdida neuronal ChAT que hemos observado en modelos que portan mutaciones en Presenilina (animales *PS1/APP*, *PS1d9/APP* y *PS1*).

Las mutaciones en *PS* son diversas y algunas confieren pérdida parcial de la función mientras que otras resultan en la pérdida completa de esta actividad (Levitan y col., 1996; Song y col., 1999; Moehlmann y col., 2002; Heilig y col., 2010). Una de estas mutaciones, la L435F causa pérdida del volumen y número neuronal a los 12 meses de edad, así como astrogliosis y microgliosis e incremento de la apoptosis, daño en la plasticidad sináptica hipocámpal y déficit de memoria (Xia y col., 2015). La extensión de la neurodegeneración asociada con la mutación L435F de *PS* es menos severa que aquella presente en los ratones *knockout* condicionales para *PS*, indicando la posibilidad de que la proteína Presenilina pueda soportar parcialmente la supervivencia neuronal en el cerebro a pesar de su pérdida de actividad γ -secretasa (Xia y col., 2015). No obstante este efecto de las mutaciones en *PS*, es dependiente de la dosis del gen. Así, se ha propuesto que los ratones *PS1^{+/-}*, con solo un alelo funcional de *PS1*, son fenotípicamente normales, indicando que el 50% de la dosis normal de *PS1* es suficiente para presentar un fenotipo normal (Shen y col., 1997).

Por otro lado, recientemente se ha propuesto que las Presenilinas podrían estar implicadas en la plasticidad sináptica y en la liberación de neurotransmisores (Zhang y col., 2009; 2010; Pratt y col., 2011). La pérdida de función PS en el terminal presináptico, altera la liberación de calcio desde el retículo endoplasmático, causando daño en la LTP (Pimplikar y col., 2010). Se ha propuesto que las Presenilinas actúan como canales de escape de calcio desde el RE, habiéndose descrito dos mutaciones del Alzheimer familiar que dañan esta función (M136V en PS1 y N141L en PS2; Tu y col., 2006). Estas mutaciones alterarían la regulación sináptica del calcio, dañando, en primer lugar, la función sináptica y, posteriormente, provocando degeneración sináptica y muerte neuronal (Wang y col., 2009; Sun y col., 2014). Así, la modulación colinérgica de la plasticidad sináptica está dañada en un ratón *konckin* para *PS1* mutado (*PS1_{KI}*; mutación *PS1M146V*). Este modelo muestra déficits de memoria a partir de los 3-4 meses de edad (Wang y col., 2004; Sun y col., 2005) y daño en la LTP (Zhang y col., 2015). Resultados similares se han obtenido en el modelo 3xTgAD (Smith y col., 2005), lo que sugiere que los efectos adversos de la mutación en *PS1* sobre la plasticidad sináptica pueden ocurrir en ausencia o presencia de la patología de placas y Tau (Wang y col., 2009).

El efecto de las Presenilinas sobre la población colinérgica ha sido previamente sugerido por Pedersen y col. (1997). Estos autores proponen que las mutaciones en Presenilina suprimen la expresión del fenotipo colinérgico que conlleva la reducción de la actividad enzimática ChAT descrita en los pacientes de la EA. De hecho, la línea celular PC12 transfectada con el gen humano *PS1* con la mutación L286V mostró una reducción superior al 90% en la actividad ChAT y en los niveles de esta proteína. Sin embargo, estos autores proponen que las mutaciones en *PS1* no comprometen la viabilidad de las células transfectadas, sino que pueden contribuir al daño cognitivo observado en la EA al causar una supresión no tóxica del fenotipo colinérgico. Aquí, hemos demostrado que la pérdida de neuronas ChAT no se debe a una pérdida del fenotipo colinérgico, ya que utilizando otro marcador específico de esta población neuronal, el receptor p75 de neurotrofinas, se ha obtenido una reducción del número de neuronas en los núcleos del telencéfalo basal similar a aquella observada para las neuronas que expresan ChAT. Es más, la cuantificación de la población marcada con ambos marcadores corroboró la pérdida neuronal colinérgica en el modelo transgénico *PS1/APP*. Para ir más allá en la determinación de la muerte de células colinérgica y no de pérdida fenotípica en esta población, se determinó mediante cuantificación estereológica de los núcleos neuronales marcados con NeuN, la disminución del número celular en el NBM, indicando, además, que en este núcleo degeneran otras poblaciones neuronales aparte de la población ChAT-positiva.

Por otro lado, *PS1* parece ser esencial para la proteólisis lisosomal al permitir la acidificación lisosomal necesaria para la activación de proteasas (Lee y col., 2010). Por tanto, las Presenilinas están implicadas en la regulación de genes asociados con la

biogénesis lisosomal (Sardiello y col., 2009), afectando la proteólisis autofágica/lisosomal. Por tanto, la carencia de *PS1* conduce a un daño en la degradación lisosomal, que conlleva la acumulación de cuerpos multivesiculares, lo que podría explicar la presencia de distrofias axonales en los animales que portan mutaciones en este gen. Además, hemos visto que estas distrofias son positivas para marcadores de autofagia como el LC3b y el marcador lisosomal LAMP2, indicando su acumulación en las distrofias colinérgicas.

El hecho de que la pérdida completa de función Presenilina o γ -secretasa recapitule lesiones claves de la EA, como la pérdida neuronal, la hiperfosforilación de Tau y los déficits de memoria, sugiere que la pérdida de función Presenilina puede subyacer a la neurodegeneración y demencia en la EA (Shen y Kelleher, 2007; Watanabe y col., 2014). Nuestro modelo no resta importancia al papel de los niveles elevados de $A\beta$, particularmente de $A\beta_{42}$, en la patogénesis de la EA. Sin embargo, aquí sugerimos un papel central de Presenilina en la degeneración del sistema colinérgico, habiendo demostrado este trabajo por primera vez la degeneración colinérgica en modelos PS1. Por ello, la estrategia terapéutica debería radicar en restaurar la función de PS, más que en inhibirla (Xia y col., 2015).

Sin embargo, no solo hemos detectado una muerte neuronal colinérgica en los animales que portan mutaciones en *PS1*, sino que ésta también se presenta en un modelo animal con mutación en *TAU*. De hecho, la pérdida de neuronas ChAT en un modelo TAU ha sido descrita previamente por Belarbi y col. (2011), quienes mostraron una reducción del 28% en el número de estas células en el *septum* medial.

Para explicar este suceso, es necesario tener en cuenta que la deficiencia en PS incrementa la estabilidad de múltiples sustratos de GSK-3, uno de los cuales es la proteína Tau (ver Sorrentino y col., 2014). Así, PS1 interactúa con la enzima GSK-3 β . De hecho la hiperfosforilación de Tau está asociada con mutaciones en *PS1* (Takashima y col., 1998; Pigino y col., 2001). Así, las mutaciones del Alzheimer familiar, que afectan a *PS1*, modifican la actividad de GSK-3 β en líneas celulares transfectadas (Takashima y col., 1998; Wehl y col., 1999). En este sentido se ha descrito que las neuronas colinérgicas del telencéfalo basal son vulnerables a la acumulación de Tau fosforilado y la formación de ovillos en los estadios tempranos del MCI y la EA (Mesulam y col., 2004) y en los cerebros de Alzheimer se ha detectado asociación entre PS1 y los ovillos neurofibrilares y las neuritas distróficas (Tomidokoro y col., 1999).

Además de su efecto sobre la proteína Tau, GSK-3 β fosforila, *in vivo*, la cadena ligera de la quinesina y causa la liberación de quinesina-1 desde los orgánulos unidos a membrana, conduciendo a una reducción en la motilidad conducida por quinesina-1 (Morfini y col., 2002). Los niveles de actividad GSK-3 β están incrementados en células que expresan mutaciones en PS1 (KIM146V) o en ausencia de PS1 (PS1^{-/-}), comprometiendo la función neuronal al afectar a la motilidad mediada por Quinesina-1

(Pigino y col., 2003). La reducción en la eficacia del transporte axonal en las neuronas afectadas podría hacerlas más vulnerables y conducir a la neurodegeneración. En este sentido, se ha propuesto que las modificaciones de Tau podrían alterar el transporte axonal dentro de los sitios de inervación colinérgica y provocar cambios en la integridad de estas sinapsis (Vana y col., 2011). Por ello, basado en resultados llevados a cabo en modelos, PS1 parece modular la actividad de GSK-3 β en neuronas (Pigino y col., 2003). De ahí, el efecto beneficioso del tratamiento con litio sobre las neuronas colinérgicas (ver material suplementario Bloque 3.3 de Resultados y Discusión), dado que el litio modula actividad de GSK-3 β (Bhat y col., 2004; Avila y col., 2010; Hernandez y col., 2013).

Por ello, aunque probablemente hay una relación entre la hiperfosforilación de Tau y la disfunción colinérgica, esta ruta todavía no se ha identificado. Tanto estudios *in vitro* como *in vivo* han demostrado que la activación de receptores muscarínicos de ACh tipo M1 disminuye la hiperfosforilación de Tau a través de la inhibición de GSK-3 β (Forlenza y col., 2000; Fisher, 2007). Además, agonistas del receptor $\alpha 7$ nicotínico modulan la actividad de GSK-3 β y reducen la fosforilación de Tau *in vitro* e *in vivo*.

Por tanto, aún queda por dilucidar la implicación de Tau y PS1 en la degeneración colinérgica. Para corroborar la afectación de esta población en modelos que portan mutaciones en PS1 hemos cuantificado las células ChAT en los tres núcleos del telencéfalo basal de animales PS1cKO de 8 meses de edad (animales cedidos por el Dr. Carlos Saura, Univ. de Barcelona). No se han obtenido diferencias significativas en la densidad numérica entre los animales WT y los PS1cKO en ninguno de los núcleos estudiados. Esto puede ser debido a la temprana edad a la que se llevó a cabo el análisis, debido a la falta de disponibilidad de animales de 12 meses (edad a la que se ha detectado la pérdida de neuronas colinérgicas en los otros modelos analizados). Este experimento está previsto que se repita cuando dispongamos de animales de 12 meses de edad.

Otra aproximación que nos hemos planteado para evaluar la implicación de PS1 en la degeneración de las células colinérgicas consiste en el tratamiento del modelo transgénico APP con el inhibidor de γ -secretasa semagacestat, para evaluar, en un modelo de la EA que carece de pérdida neuronal colinérgica, la vulnerabilidad de esta población a la pérdida de actividad de γ -secretasa. Además de esta aproximación *in vivo*, nos planteamos un estudio *in vitro*, en el que un cultivo de neuronas colinérgicas procedentes del *septum* sean incubadas con este inhibidor de γ -secretasa, de manera que así podamos evaluar su toxicidad sobre esta población. Actualmente, el grupo del Dr. Vitorica está llevando a cabo los cultivos con la región del *septum* medial para la obtención de células colinérgicas.

También se ha propuesto como posible explicación a la degeneración de células colinérgicas del BF, la pérdida, por parte de estas neuronas, de la proteína ligadora de calcio calbindina (Riascos y col., 2014), debido a la implicación de las alteraciones en la homeostasis del calcio intracelular en la disfunción neuronal (Karkany y col., 2000; Green

y col., 2007). La subpoblación en la que se pierde la expresión de calbindina es susceptible de un incremento en la fosforilación de Tau que conduce a la degeneración (Riascos y col., 2011). Sin embargo, la calbindina está presente en la mayoría de células colinérgicas en humanos y primates no humanos, pero no en roedores (Chang y Kuo, 1991; Geula y col., 1993), por lo que esta explicación no puede ser considerada para esclarecer la muerte de células ChAT descrita en nuestro trabajo.

Por último, se ha propuesto un papel importante de la neuroinflamación en la patogénesis de la EA (Akiyama y col., 2000) y la degeneración del sistema colinérgico del BF (Wenk y col., 2000; Schliebs y Arendt, 2006). De hecho, la infusión crónica de TNF- α en el telencéfalo basal de ratones jóvenes incrementa el número de micro- y astroglia activada y disminuye el número de células colinérgicas (Wenk y col., 2003) y la actividad ChAT. Pero, la presencia de la mutación *Swedish* en el gen APP no provoca un incremento en la vulnerabilidad neuronal a la neuroinflamación crónica (Wenk y col., 2004). Otro estudio que apoya la implicación del proceso neuroinflamatorio en la degeneración del sistema colinérgico es el publicado por Foley y col. (1998), en el que se aislaron anticuerpos del suero de pacientes de la EA que, selectivamente, reconocían y destruían células colinérgicas del BF cuando se inyectaban en el cerebro de rata. Por otro lado, la hipofunción colinérgica puede contribuir a la respuesta inflamatoria al reducir la regulación colinérgica de la activación microglial a través de receptores $\alpha 7$ nicotínicos (Shytle y col., 2004). Aquí hemos mostrado la presencia de un proceso neuroinflamatorio, con activación astro- y microglial, en los núcleos colinérgicos del BF, que podría contribuir a la degeneración neuronal.

Una vez comprobada la degeneración del sistema colinérgico en nuestro modelo, y teniendo en cuenta la disfunción en las capacidades cognoscitivas que caracteriza a la EA, procedimos a analizar la función cognitiva, ya que la pérdida de neuronas colinérgicas se ha correlacionado con el déficit cognitivo. De hecho un estudio ha mostrado que trasplantando células madres que sobreexpresan ChAT en el cerebro de una rata modelo de la EA, se recupera completamente el déficit de aprendizaje y memoria y se inducen unos niveles elevados de ACh en el líquido cefalorraquídeo (Park y col., 2012).

La acetilcolina es un neurotransmisor esencial en la memoria (Matsuyama y col., 2000; Rasmusson, 2000; Ji y col., 2001; Lucas-Meunier y col., 2003; Shinoe y col., 2005; Li y col., 2007). Este neurotransmisor actúa en una gran cantidad de funciones cognitivas y está implicado en la memoria de trabajo espacial (Lucas-Meunier y col., 2003). Como se observa en la Tabla 3.2.2, las regiones cerebrales del BF juegan un papel esencial en funciones como el aprendizaje, la memoria y la atención (Everitt y Robbins, 1997; Baxter y Chiba, 1999; Sarter y Bruno, 2000; Sarter y col., 2003; Weinberger, 2003). De este modo, el daño de la señalización colinérgica está implicado en la pérdida temprana de memoria que acontece durante la EA y, de hecho, los inhibidores de acetilcolinesterasa mejoran la cognición en algunos pacientes de la enfermedad (LLeó y col., 2006).

Tabla 3.2.2. Funciones en las que está implicado el telencéfalo basal. El NBM se ha relacionado ampliamente con los procesos de atención, adquisición y consolidación de la información y la memoria, debido a su implicación en la plasticidad sináptica. Por otro lado, se ha descrito que la vía septohipocampal tiene un papel esencial en la memoria de trabajo espacial.

Región cerebral		Eferencias	Neurotransmisores	Funciones
Telencéfalo basal (BF)	Área septal medial	Hipocampo	Acetilcolina	-Aprendizaje y memoria -Control hipocampal -Procesamiento sensorial
	Núcleo basal de Meynert	Neocorteza	Acetilcolina, GABA, glutamato, neuropéptidos	-Activación límbica y cortical -Atención, aprendizaje y memoria -Procesamiento sensorial -Regulación sueño/vigilia

Por ello analizamos la memoria de reconocimiento de objetos en los modelos PS1 y PS1/APP, modelos en los que se ha demostrado un déficit colinérgico (está por realizar este análisis de la memoria en los animales TAU). En este análisis conductual se tuvieron en cuenta dos factores, el reconocimiento de objetos propiamente dicho (ratio de objeto) y el reconocimiento de lugar (ratio de desplazamiento). Este test está basado en la preferencia por el “objeto viejo familiar” sobre el “objeto reciente” y la preferencia por una nueva localización (Davis y col., 2013). Como era de esperar, los animales controles distinguieron perfectamente el objeto nuevo del antiguo y su localización inicial de la nueva, mientras que los animales transgénicos (PS1 y PS1/APP) no fueron capaces de discernir ambos aspectos, obteniéndose diferencias significativas en ambos índices.

Previamente se ha descrito que la sobreexpresión del gen *PS1* mutado induce una alteración en la memoria de reconocimiento de objetos (Vaucher y col., 2002), que está en consonancia con los datos obtenidos en este trabajo. Sin embargo, estos autores no han encontrado ninguna alteración neuroquímica colinérgica. Además, hay datos que apoyan nuestros resultados que relacionan el déficit en el reconocimiento de objetos con la alteración del sistema colinérgico. La delección colinérgica mediante la infusión intracerebroventricular de la inmunotoxina murina p75-saporina (SAP) en ratones C57BL/6 correlaciona con déficits de aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris (Berger-Sweeney y col., 1994; 2001; Moreau y col., 2008) y en el laberinto de Barnes (Moreau y col., 2008). El uso de esta toxina en el modelo transgénico Tg2576 conduce a la degeneración parcial de las células colinérgicas del BF a los 3 meses de edad y un daño en la memoria de trabajo espacial y la memoria espacial a largo plazo a los 9 meses (Laursen y col., 2014) que no aparecen en ratones Tg2576 sin lesión. Además, el modelo PS1d9/APP^{swe} lesionado con SAP también muestra déficits en el laberinto en T (Laursen y col., 2013).

Aunque no podemos relacionar directamente los déficits de memoria en ambos modelos (PS1 y PS1/APP) con la degeneración colinérgica, hay algunas evidencias a su favor. En este sentido, es cierto que en estos modelos también hay afectación de otras poblaciones neuronales (interneuronas GABAérgicas en hipocampo) que podrían explicar

parte de la sintomatología, sin embargo ésta es mayor en PS1/APP que en el modelo PS1 (Ramos y col., 2006; resultados del subículo de este trabajo), y además es de destacar que el modelo PS1, a diferencia del PS1/APP carece de patología amiloidea. Conjuntamente, y hasta donde conocemos, la patología es menor en el modelo monogénico PS1, por lo que sería esperable que los déficits cognitivos fueran menores que en el modelo PS1/APP a la misma edad. Sin embargo, los déficits cognitivos detectados mediante la prueba de reconocimiento de objetos son similares en magnitud en ambos modelos, y lo que ambos modelos comparten para explicar este hecho es la degeneración colinérgica. No disponemos de datos conductuales del modelo APP que pudieran aportar nuevas evidencias en este asunto, aunque en estos momentos se están envejeciendo animales en nuestro Estabulario para poder realizarlos en breve.

CONCLUSIÓN

La pérdida de neuronas colinérgicas en diferentes núcleos del telencéfalo basal se produce en modelos transgénicos que portan mutaciones en *PS1* y *TAU*, no habiéndose observado en un modelo monogénico APP. Esto indica una implicación de las mutaciones en PS1 (pérdida de función γ -secretasa), probablemente a través de su implicación en la patología de Tau, en la degeneración neuronal colinérgica, indicando una nueva vía que explica la vulnerabilidad de esta población neuronal independiente del efecto tóxico del A β sobre las células. Estos modelos transgénicos con pérdida colinérgica son, por un lado, de alto valor para descifrar las causas que determinan la muerte selectiva de las neuronas colinérgicas, y por otro lado poseen un alto valor predictivo para estudios preclínicos dirigidos a proteger o restablecer la función colinérgica.

BIBLIOGRAFÍA

- Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T.** (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 21(3):383-421.
- Amtul Z, Lewis PA, Piper S, Crook R, Baker M, Findlay K, Singleton A, Hogg M, Younkin L, Younkin SG, Hardy J, Hutton M, Boeve BF, Tang-Wai D, Golde TE.** (2002). A presenilin 1 mutation associated with familial frontotemporal dementia inhibits gamma-secretase cleavage of APP and notch. *Neurobiol Dis.*, 9(2):269-273.
- Aoki C, Kabak S.** (1992). Cholinergic terminals in the cat visual cortex: ultrastructural basis for interaction with glutamate-immunoreactive neurons and other cells. *Vis Neurosci.*, 8(3):177-191.
- Apelt J, Kumar A, Schliebs R.** (2002). Impairment of cholinergic neurotransmission in adult and aged transgenic Tg2576 mouse brain expressing the Swedish mutation of human beta-amyloid precursor protein. *Brain Res.*, 953(1-2):17-30.
- Armstrong DM, Saper CB, Levey AI, Wainer BH, Terry RD.** (1983). Distribution of cholinergic neurons in rat brain: demonstrated by the immunocytochemical localization of choline acetyltransferase. *J Comp Neurol.*, 216(1):53-68.
- Auerbach JM, Segal M.** (1994). A novel cholinergic induction of long-term potentiation in rat hippocampus. *J Neurophysiol.*, 72(4):2034-2040.

- Auerbach JM, Segal M.** (1996). Muscarinic receptors mediating depression and long-term potentiation in rat hippocampus. *J Physiol.*, 492(Pt 2):479-493.
- Avendaño C, Umbriaco D, Dykes RW, Descarries L.** (1996). Acetylcholine innervation of sensory and motor neocortical areas in adult cat: a choline acetyltransferase immunohistochemical study. *J Chem Neuroanat.*, 11(2):113-130.
- Avila J, Wandosell F, Hernandez F.** (2010). Role of glycogen synthase kinase-3 in Alzheimer's disease pathogenesis and glycogen synthase kinase-3 inhibitors. *Expert Rev Neurotherapeutics*, 10:703-710.
- Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuete M, Vitorica J, Gutierrez A.** (2010). Calretinin interneurons are early targets of extracellular amyloid-beta pathology in PS1/AbetaPP Alzheimer mice hippocampus. *J Alzheimers Dis.*, 21:119-132.
- Baker-Nigh A, Vahedi S, Davis EG, Weintraub S, Bigio EH, Klein WL, Geula C.** (2015). Neuronal amyloid- β accumulation within cholinergic basal forebrain in ageing and Alzheimer's disease. *Brain*, 138:1722-1737.
- Bales KR, Tzavara ET, Wu S, Wade MR, Bymaster FP, Paul SM, Nomikos GG.** (2006). Cholinergic dysfunction in a mouse model of Alzheimer disease is reversed by an anti-A beta antibody. *J Clin Invest.*, 116(3):825-832.
- Bartus RT.** (2000). On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp Neurol.*, 163(2):495-529.
- Baskerville KA, Kent C, Nicolle MM, Gallagher M, McKinney M.** (2006). Aging causes partial loss of basal forebrain but no loss of pontine reticular cholinergic neurons. *Neuroreport*, 17(17):1819-1823.
- Baxter MG, Chiba AA.** (1999). Cognitive functions of the basal forebrain. *Curr Opin Neurobiol.*, 9(2):178-183.
- Beach TG.** (2008). Physiologic origins of age-related beta-amyloid deposition. *Neurodegener Dis.*, 5(3-4):143-145.
- Beglopoulos V, Sun X, Saura CA, Lemere CA, Kim RD, Shen J.** (2004). Reduced beta-amyloid production and increased inflammatory responses in presenilin conditional knock-out mice. *J Biol Chem.*, 279(45):46907-46914.
- Belarbi K, Burnouf S, Fernandez-Gomez FJ, Desmercieres J, Troquier L, Brouillette J, Tsambou L, Grosjean ME, Caillierez R, Demeyer D, Hamdane M, bSchindowski K, Blum D, Buée L.** (2011). Loss of medial septum cholinergic neurons in THY-Tau22 mouse model: what links with tau pathology? *Curr Alzheimer Res.*, 8(6):633-638.
- Bellucci A, Luccarini I, Scali C, Prosperi C, Giovannini MG, Pepeu G, Casamenti F.** (2006). Cholinergic dysfunction, neuronal damage and axonal loss in TgCRND8 mice. *Neurobiol Dis.*, 23(2):260-272.
- Beglopoulos V, Sun X, Saura CA, Lemere CA, Kim RD, Shen J.** (2004). Reduced beta-amyloid production and increased inflammatory responses in presenilin conditional knock-out mice. *J Biol Chem.*, 279(45):46907-46914.
- Berger-Sweeney J, Heckers S, Mesulam MM, Wiley RG, Lappi DA, Sharma M.** (1994). Differential effects on spatial navigation of immunotoxin-induced cholinergic lesions of the medial septal area and nucleus basalis magnocellularis. *J Neurosci.*, 14:4507-4519.
- Berger-Sweeney J, Stearns NA, Murg SL, Floerke-Nashner LR, Lappi DA, Baxter MG.** (2001). Selective immunolesions of cholinergic neurons in mice: effects on neuroanatomy, neurochemistry, and behavior. *J Neurosci.*, 21:8164-8173.
- Bhat RV, Budd Haeberlein SL, Avila J.** (2004). Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *J Neurochem.*, 89:1313-1317.
- Bierer LM, Haroutunian V, Gabriel S, Knott PJ, Carlin LS, Purohit DP, Perl DP, Schmeidler J, Kanof P, Davis KL.** (1995). Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. *J Neurochem.*, 64(2):749-760.
- Bigl V, Arendt T.** (1991). Cholinergic neurons of the central nervous system: morphofunctional aspects. *Acta Psychiatr Scand Suppl.*, 366:7-13.
- Billings LM, Oddo S, Green KN, McLaugh JL, LaFerla FM.** (2005). Intraneuronal A beta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron*, 45(5):675-688.
- Bitner RS, Nikkel AL, Markosyan S, Otte S, Puttfarcken P, Gopalakrishnan M.** (2009). Selective alpha7 nicotinic acetylcholine receptor activation regulates glycogen synthase kinase3beta and decreases tau phosphorylation in vivo. *Brain Res.*, 1265:65e74.
- Blusztajn JK, Berse B.** (2000). The cholinergic neuronal phenotype in Alzheimer's disease. *Metab Brain Dis.*, 15(1):45-64.
- Boncristiano S, Calhoun ME, Kelly PH, Pfeifer M, Bondolfi L, Stalder M, Phinney AL, Abramowski D, Sturchler-Pierrat C, Enz A, Sommer B, Staufenbiel M, Jucker M.** (2002). Cholinergic changes in the APP23 transgenic mouse model of cerebral amyloidosis. *J Neurosci.*, 22(8):3234-3243.
- Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada CM, Kim G, Seekins S, Yager D, Slunt HH, Wang**

- R, Seeger M, Levey AI, Gandy SE, Copeland NG, Jenkins NA, Price DL, Younkin SG, Sisodia SS.** (1996). Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron*, 17(5):1005-1013.
- Bowen DM, Smith CB, White P, Davison AN.** (1976). Neurotransmitter-related enzymes and indices of hypoxia in senile dementia and other abiotrophies. *Brain*, 99(3):459-496.
- Bowen DM, Benton JS, Spillane JA, Smith CC, Allen SJ.** (1982). Choline acetyltransferase activity and histopathology of frontal neocortex from biopsies of demented patients. *J Neurol Sci.*, 57(2-3):191-202.
- Broide RS, Leslie FM.** (1999). The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in neuronal plasticity. *Mol Neurobiol.*, 20(1):1-16.
- Bronfman FC, Moechars D, Van Leuven F.** (2000). Acetylcholinesterase-positive fiber deafferentation and cell shrinkage in the septohippocampal pathway of aged amyloid precursor protein london mutant transgenic mice. *Neurobiol Dis.*, 7(3):152-168.
- Buttini M, Yu GQ, Shockley K, Huang Y, Jones B, Masliah E, Mallory M, Yeo T, Longo FM, Mucke L.** (2002). Modulation of Alzheimer-like synaptic and cholinergic deficits in transgenic mice by human apolipoprotein E depends on isoform, aging, and overexpression of amyloid beta peptides but not on plaque formation. *J Neurosci.*, 22(24):10539-10548.
- Cataldo AM, Petanceska S, Terio NB, Peterhoff CM, Durham R, Mercken M, Mehta PD, Buxbaum J, Haroutunian V, Nixon RA.** (2004). Abeta localization in abnormal endosomes: association with earliest Abeta elevations in AD and Down syndrome. *Neurobiol Aging*, 25(10):1263-1272.
- Chang HT, Kuo H.** (1991). Relationship of calbindin D-28k and cholinergic neurons in the nucleus basalis of Meynert of the monkey and the rat. *Brain Res.*, 549(1):141-145.
- Choi JH, Kaur G, Mazzella MJ, Morales-Corraliza J, Levy E, Mathews PM.** (2013). Early endosomal abnormalities and cholinergic neuron degeneration in amyloid- β protein precursor transgenic mice. *J Alzheimers Dis.*, 34(3):691-700.
- Christensen DZ, Bayer TA, Wirths O.** (2010). Intracellular A β triggers neuron loss in the cholinergic system of the APP/PS1KI mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 31(7):1153-1163.
- Coulson EJ, May LM, Sykes AM, Hamlin AS.** (2009). The role of the p75 neurotrophin receptor in cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease. *Neuroscientist*, 15(4):317-323.
- Counts SE, Mufson EJ.** (2005). The role of nerve growth factor receptors in cholinergic basal forebrain degeneration in prodromal Alzheimer disease. *JNeuropathol Exp Neurol.*, 64(4):263-272.
- Coyle JT, Price DL, DeLong MR.** (1983). Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*, 219:1184-1190.
- Craig LA, Hong NS, McDonald RJ.** (2011). Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neurosci Biobehav Rev.*, 35(6):1397-1409.
- Cuello AC, Bruno MA, Allard S, Leon W, Iulita MF.** (2010). Cholinergic involvement in Alzheimer's disease. A link with NGF maturation and degradation. *J Mol Neurosci.*, 40(1-2):230-235.
- Davies P, Maloney AJ.** (1976). Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*, 2(8000):1403.
- Davis KE, Eston A, Eacott MJ, Gigg J.** (2013). Episodic-like memory for What-Where-Which occasion is selectively impaired in the 3xTgAD mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.*, 33:681-698.
- DeKosky ST, Harbaugh RE, Schmitt FA, Bakay RA, Chui HC, Knopman DS, Reeder TM, Shetter AG, Senter HJ, Markesbery WR.** (1992). Cortical biopsy in Alzheimer's disease: diagnostic accuracy and neurochemical, neuropathological, and cognitive correlations. Intraventricular Bethanecol Study Group. *Ann Neurol.*, 32(5):625-632.
- De Lacalle S, Cooper JD, Svendsen CN, Dunnett SB, Sofroniew MV.** (1996). Reduced retrograde labelling with fluorescent tracer accompanies neuronal atrophy of basal forebrain cholinergic neurons in aged rats. *Neuroscience*, 75(1):19-27.
- Dermaut B, Kumar-Singh S, Engelborghs S, Theuns J, Rademakers R, Saerens J, Pickut BA, Peeters K, van den Broeck M, Vennekens K, Claes S, Cruts M, Cras P, Martin JJ, Van Broeckhoven C, De Deyn PP.** (2004). A novel presenilin 1 mutation associated with Pick's disease but not beta-amyloid plaques. *Ann Neurol.*, 55(5):617-626.
- Devi L, Ohno M.** (2010). Phospho-eIF2 α level is important for determining abilities of BACE1 reduction to rescue cholinergic neurodegeneration and memory defects in 5XFAD mice. *PLoS One*, 5(9):e12974.
- Dickson TC, King CE, McCormack G, Vickers JC.** (1999). Neurochemical diversity of the dystrophic neurites in the early and late stages of Alzheimer's disease. *Exp Neurol.*, 156:100-110.
- Dickson DW, Vickers JC.** (2001). The morphological phenotype of beta-amyloid plaques and associated neuritic changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 105:99-107.
- Diez M, Danner S, Frey P, Sommer B, Staufenbiel M, Wiederhold KH, Hökfelt T.** (2003). Neuropeptide alterations in the hippocampal formation and cortex of transgenic mice overexpressing beta-amyloid precursor

- protein (APP) with the Swedish double mutation (APP23). *Neurobiol Dis.*, 14(3):579-594.
- Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y, Yager D, Morgan D, Gordon MN, Holcomb L, Refolo L, Zenk B, Hardy J, Younkin S.** (1996). Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature*, 383(6602):710-713.
- Dumas JA, Newhouse PA.** (2011). The cholinergic hypothesis of cognitive aging revisited again: cholinergic functional compensation. *Pharmacol Biochem Behav.*, 99(2):254-261.
- Duyckaerts C, Potier MC, Delatour B.** (2008). Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol.*, 115:5-38.
- Ellis JR, Ellis KA, Bartholomeusz CF, Harrison BJ, Wesnes KA, Erskine FF, Vitetta L, Nathan PJ.** (2006). Muscarinic and nicotinic receptors synergistically modulate working memory and attention in humans. *Int J Neuropsychopharmacol.*, 9:175-189.
- Everitt BJ, Robbins TW.** (1997). Central cholinergic systems and cognition. *Annu Rev Psychol.*, 48:649-684.
- Feng R, Wang H, Wang J, Shrom D, Zeng X, Tsien JZ.** (2004). Forebrain degeneration and ventricle enlargement caused by double knockout of Alzheimer's presenilin-1 and presenilin-2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(21):8162-8167.
- Fisher A.** (2007). M1 muscarinic agonists target major hallmarks of Alzheimer's disease – an update. *Curr Alzheimer Res.*, 4:577-580.
- Foley P, Bradford HF, Docherty M, Fillit H, Luine VN, McEwen B, Bucht G, Winblad B, Hardy J.** (1988). Evidence for the presence of antibodies to cholinergic neurons in the serum of patients with Alzheimer's disease. *J Neurol.*, 235(8):466-471.
- Forlenza OV, Spink JM, Dayanandan R, Anderton BH, Olesen OF, Lovestone S.** (2000). Muscarinic agonists reduce tau phosphorylation in non-neuronal cells via GSK-3beta inhibition and in neurons. *J Neural Transm.*, 107:1201-1212.
- Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F, Guido T, Hagopian S, Johnson-Wood K, Khan K, Lee M, Leibowitz P, Lieberbug I, Little S, Masliah E, McConlogue L, Montoya-Zavala M, Mucke L, Paganini L, Penniman E, Power M, Schenk D, Seubert P, Snyder B, Soriano F, Tan H, Vitale J, Wadsworth S, Wolozin B, Zhao J.** (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature*, 373(6514):523-527.
- German DC, Yazdani U, Speciale SG, Pasbakhsh P, Games D, Liang CL.** (2003). Cholinergic neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Comp Neurol.*, 462(4):371-381.
- Geula C, Schatz CR, Mesulam MM.** (1993). Differential localization of NADPH-diaphorase and calbindin-D28k within the cholinergic neurons of the basal forebrain, striatum and brainstem in the rat, monkey, baboon and human. *Neuroscience*, 54(2):461-476.
- Geula C, Mesulam MM.** (1996). Systematic regional variations in the loss of cortical cholinergic fibers in Alzheimer's disease. *Cereb Cortex*, 6(2):165-177.
- Geula C, Mesulam MM, Saroff DM, Wu CK.** (1998). Relationship between plaques, tangles, and loss of cortical cholinergic fibers in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 57(1):63-75.
- Geula C, Nagykerly N, Nicholas A, Wu CK.** (2008). Cholinergic neuronal and axonal abnormalities are present early in aging and in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 67(4):309-318.
- Gil-Bea FJ, Garcia-Alloza M, Dominguez J, Marcos B, Ramirez MJ.** (2005). Evaluation of cholinergic markers in Alzheimer's disease and in a model of cholinergic deficit. *Neurosci Lett.*, 375:37-41.
- Ginsberg SD, Che S, Wu J, Counts SE, Mufson EJ.** (2006). Down regulation of trk but not p75NTR gene expression in single cholinergic basal forebrain neurons mark the progression of Alzheimer's disease. *J Neurochem.*, 97(2):475-487.
- Golebiewski H, Eckersdorf B, Konopacki J.** (1999). The effect of intraseptal procaine injection of hippocampal theta in freely moving cat. *Brain Res Bull.*, 49(6):407-412.
- Gomez-Isla T, Spires T, De Calignon A, Hyman BT.** (2008). Neuropathology of Alzheimer's disease. *Handb Clin Neurol.*, 89:233-243.
- Green KN, Smith IF, LaFerla FM.** (2007). Role of calcium in the pathogenesis of Alzheimer's disease and transgenic models. In: Carafoli E, Brini M. editors. Calcium Signalling and Disease. *Subcell Biochem.*, 45:507-521.
- Grothe M, Zaborszky L, Atienza M, Gil-Neciga E, Rodriguez-Romero R, Teipel SJ, Amunts K, Suarez-Gonzalez A, Cantero JL.** (2010). Reduction of basal forebrain cholinergic system parallels cognitive impairment in patients at high risk of developing Alzheimer's disease. *Cereb Cortex*, 20(7):1685-1695.
- Handler M, Yang X, Shen J.** (2000). Presenilin-1 regulates neuronal differentiation during neurogenesis. *Development*, 127(12):2593-2606.
- Hansen RA, Gartlehner G, Webb AP, Morgan LC, Moore CG, Jonas DE.** (2008). Efficacy and safety of donepezil, galantamine, and rivastigmine for the treatment of Alzheimer's

- disease: a systematic review and meta-analysis. *Clin Interv Aging*, 3(2):211-225.
- Hardy J.** (1997). Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.*, 20(4):154-159.
- Hardy J, Selkoe DJ.** (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580):353-356.
- Harkany T, Abraham I, Timmerman W, Laskay G, Toth B, Sasvari M, Kónya C, Sebens JB, Korf J, Nyakas C, Zarándi M, Soós K, Penke B, Luiten PG.** (2000). β -Amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate-triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis. *Eur J Neurosci.*, 12:2735-2745.
- Harvey J, Balasubramaniam R, Collingridge GL.** (1993). Carbachol can potentiate N-methyl-D-aspartate responses in the rat hippocampus by a staurosporine and thapsigargin-insensitive mechanism. *Neurosci Lett.*, 162(1-2):165-168.
- Heilig EA, Xia W, Shen J, Kelleher RJ 3rd.** (2010). A presenilin-1 mutation identified in familial Alzheimer disease with cotton wool plaques causes a nearly complete loss of gamma-secretase activity. *J Biol Chem.*, 285(29):22350-59.
- Heilig EA, Gutti U, Tai T, Shen J, Kelleher RJ 3rd.** (2013). Trans-dominant negative effects of pathogenic PSEN1 mutations on γ -secretase activity and A β production. *J Neurosci.*, 33(28):11606-11617.
- Heneka MT, Ramanathan M, Jacobs AH, Dumitrescu-Ozimek L, Bilkei-Gorzo A, Debeer T, Sastre M, Galldikis N, Zimmer A, Hoehn M, Heiss WD, Klockgether T, Staufenbiel M.** (2006). Locus ceruleus degeneration promotes Alzheimer pathogenesis in amyloid precursor protein 23 transgenic mice. *J Neurosci.*, 26(5):1343-1354.
- Hernandez F, Lucas JJ, Avila J.** (2013). GSK3 and Tau: Two Convergence Points in Alzheimer's Disease. *J Alzheimer Dis.*, 33:S141-S144.
- Hoshi M, Takashima A, Murayama M, Yasutake K, Yoshida N, Ishiguro K, Hoshino T, Imahori K.** (1997). Nontoxic amyloid beta peptide 1-42 suppresses acetylcholine synthesis. Possible role in cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease. *J Biol Chem.*, 272(4):2038-41.
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G.** (1996). Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*, 274(5284):99-102.
- Hu M, Waring JF, Gopalakrishnan M, Li J.** (2008). Role of GSK-3 β activation and alpha7 nAChRs in A β (1-42)-induced tau phosphorylation in PC12 cells. *J Neurochem.*, 106:1371e1377
- Inestrosa NC, Alvarez A, Pérez CA, Moreno RD, Vicente M, Linker C, Casanueva OI, Soto C, Garrido J.** (1996). Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta-peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron*, 16(4):881-891.
- Irizarry MC, McNamara M, Fedorchak K, Hsiao K, Hyman BT.** (1997). APPSw transgenic mice develop age-related A β deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 56(9):965-973.
- Jaffar S, Counts SE, Ma SY, Dadko E, Gordon MN, Morgan D, Mufson EJ.** (2001). Neuropathology of mice carrying mutant APP(swe) and/or PS1(M146L) transgenes: alterations in the p75(NTR) cholinergic basal forebrain septohippocampal pathway. *Exp Neurol.*, 170(2):227-243.
- Jankowsky JK, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Lee MK, Younkin LH, Wagner SL, Younkin SG, Borchelt DR.** (2004). Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum Mol Genet.*, 13(2):159-170.
- Ji D, Lape R, Dani JA.** (2001). Timing and location of nicotinic activity enhances or depresses hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*, 31(1):131-141.
- Jimenez S, Baglietto-Vargas D, Caballero C, Moreno-Gonzalez I, Torres M, Sanchez-Varo R, Ruano D, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J.** (2008). Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *J Neurosci.*, 28(45):11650-61.
- Kar S, Seto D, Gaudreau P, Quirion R.** (1996). Beta-amyloid-related peptides inhibit potassium-evoked acetylcholine release from rat hippocampal slices. *J Neurosci.*, 16(3):1034-1040.
- Kasashima S, Kawashima A, Muroishi Y, Futakuchi H, Nakanishi I, Oda Y.** (1999). Neurons with choline acetyltransferase immunoreactivity and mRNA are present in the human cerebral cortex. *Histochem Cell Biol.*, 111(3):197-207.
- Kelleher RJ 3rd, Shen J.** (2010). Genetics. Gamma-secretase and human disease. *Science*, 330(6007):1055-1056.
- Kilimann I, Grothe M, Heinsen H, Alho EJ, Grinberg L, Amaro E Jr, Dos Santos GA, da Silva RE, Mitchell AJ, Frisoni GB, Bokde AL, Fellgiebel A, Filippi M, Hampel H, Klöppel S, Teipel SJ.** (2014). Subregional basal forebrain atrophy in Alzheimer's disease: a multicenter study. *J Alzheimers Dis.*, 40(3):687-700.

- Knowles JK, Rajadas J, Nguyen TV, Yang T, LeMieux MC, Vander Griend L, Ishikawa C, Massa SM, Wyss-Coray T, Longo FM.** (2009). The p75 neurotrophin receptor promotes amyloid-beta(1-42)-induced neuritic dystrophy in vitro and in vivo. *J Neurosci.*,29(34):10627-37.
- Laursen B, Kristiansen U, Plath N, Mork A, Bastlund JF.** (2013). Cholinergic degeneration is associated with increased plaque deposition and cognitive impairment in APP^{swe}/PS1^{dE9} mice. *Behav Brain Res.*, 240:146-152.
- Laursen B, Mørk A, Plath N, Kristiansen U, Bastlund JF.** (2014). Impaired hippocampal acetylcholine release parallels spatial memory deficits in Tg2576 mice subjected to basal forebrain cholinergic degeneration. *Brain Res.*, 1543:253-262.
- Lee JH, Yu WH, Kumar A, Lee S, Mohan PS, Peterhoff CM, Wolfe DM, Martinez-Vicente M, Massey AC, Sovak G, Uchiyama Y, Westaway D, Cuervo AM, Nixon RA.** (2010). Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell*, 141(7):1146-1158.
- Lee SH, Sharma M, Südhof TC, Shen J.** (2014). Synaptic function of nicastrin in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(24):8973-8978.
- Leranth C, Hajszan T.** (2007). Extrinsic afferent systems to the dentate gyrus. *Prog Brain Res.*, 163:63-84.
- Levitan D, Doyle TG, Brousseau D, Lee MK, Thinakaran G, Slunt HH, Sisodia SS, Greenwald I.** (1996). Assessment of normal and mutant human presenilin function in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(25):14940-14944.
- Li S, Cullen WK, Anwyl R, Rowan MJ.** (2007). Muscarinic acetylcholine receptor-dependent induction of persistent synaptic enhancement in rat hippocampus in vivo. *Neuroscience*, 144(2):754-761.
- Liu Q, Kawai H, Berg DK.** (2001). beta -Amyloid peptide blocks the response of alpha 7-containing nicotinic receptors on hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(8):4734-4739.
- Lleó A, Greenberg SM, Growdon JH.** (2006). Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease. *Annu Rev Med.*, 57:513-533.
- Lucas-Meunier E, Fossier P, Baux G, Amar M.** (2003). Cholinergic modulation of the cortical neuronal network. *Pflugers Arch.*, 446(1):17-29.
- Lüth HJ, Apelt J, Ihunwo AO, Arendt T, Schliebs R.** (2003). Degeneration of beta-amyloid-associated cholinergic structures in transgenic APP SW mice. *Brain Res.*, 977(1):16-22.
- Matsuyama S, Matsumoto A, Enomoto T, Nishizaki T.** (2000). Activation of nicotinic acetylcholine receptors induces long-term potentiation in vivo in the intact mouse dentate gyrus. *Eur J Neurosci.*, 12(10):3741-3747.
- Mesulam MM, Mufson EJ, Wainer BH, Levey AI.** (1983). Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience*, 10(4):1185-1201.
- Mesulam MM.** (1986). Alzheimer plaques and cortical cholinergic innervation. *Neuroscience*, 17(1):275-276.
- Mesulam MM.** (2004). The cholinergic innervation of the human cerebral cortex. *Prog Brain Res.*, 145:67-78.
- Mesulam M, Shaw P, Mash D, Weintraub S.** (2004). Cholinergic nucleus basalis tauopathy emerges early in the aging-MCI-AD continuum. *Ann Neurol.*, 55(6):815-828.
- Meyer-Luehmann M, Spire-Jones TL, Prada C, Garcia-Alloza M, de Calignon A, Rozkalne A, Koenigsknecht-Talboo J, Holtzman DM, Bacskaí BJ, Hyman BT.** (2008). Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature*, 451(7179):720-724.
- Moehlmann T, Winkler E, Xia X, Edbauer D, Murrell J, Capell A, Kaether C, Zheng H, Ghatti B, Haass C, Steiner H.** (2002). Presenilin-1 mutations of leucine 166 equally affect the generation of the Notch and APP intracellular domains independent of their effect on Abeta 42 production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(12):8025-8030.
- Morán MA, Mufson EJ, Gómez-Ramos P.** (1993). Colocalization of cholinesterases with beta amyloid protein in aged and Alzheimer's brains. *Acta Neuropathol.*, 85(4):362-369.
- Moreau PH, Cosquer B, Jeltsch H, Cassel JC, Mathis C.** (2008). Neuroanatomical and behavioral effects of a novel version of the cholinergic immunotoxin mup75-saporin mice. *Hippocampus*, 18:610-622.
- Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Del Rio JC, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuete M, Vitorica J, Gutierrez A.** (2009). Extracellular amyloid-beta and cytotoxic glial activation induce significant entorhinal neuron loss in Young PS1(M146L)/APP(751SL) mice. *J Alzheimers Dis.*, 18(4):755-776.
- Morfini G, Szebenyi G, Elluru R, Ratner N, Brady ST.** (2002). Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin-based motility. *EMBO J.*, 21(3):281-293.
- Mori I, Ohshima Y.** (1995). Neural regulation of thermotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 376(6538):344-348.
- Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K,**

- Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L.** (2000). High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci.*, 20(11):4050-4058.
- Mufson EJ, Conner JM, Kordower JH.** (1995). Nerve growth factor in Alzheimer's disease: defective retrograde transport to nucleus basalis. *Neuroreport*, 6(7):1063-1066.
- Mufson EJ, Deecher DC, Basile M, Izenwasse S, Mash DC.** (2000a). Galanin receptor plasticity within the nucleus basalis in early and late Alzheimer's disease: an in vitro autoradiographic analysis. *Neuropharmacology*, 39(8):1404-1412.
- Mufson EJ, Ma SY, Cochran EJ, Bennett DA, Beckett LA, Jaffar S, Saragovi HU, Kordower JH.** (2000b). Loss of nucleus basalis neurons containing trkA immunoreactivity in individuals with mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease. *J Comp Neurol.*, 427(1):19-30.
- Nagele RG, D'Andrea MR, Anderson WJ, Wang HY.** (2002). Intracellular accumulation of beta-amyloid(1-42) in neurons is facilitated by the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 110(2):199-211.
- Navarrete F, Pérez-Ortiz JM, Femenía T, García-Gutiérrez MS, García-Payá ME, Leiva-Santana C, Manzanares J.** (2008). *Rev Neurol.*, 47(3):137-145.
- Niewiadomska G, Baksalerska-Pazera M, Riedel G.** (2009). The septo-hippocampal system, learning and recovery of function. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.*, 33(5):791-805.
- Niewiadomska G, Mielenska-Porowska A, Mazurkiewicz M.** (2011). The cholinergic system, nerve growth factor and the cytoskeleton. *Behav Brain Res.*, 221(2):515-526.
- Nitsch RM, Slack BE, Wurtman RJ, Growdon JH.** (1992). Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science*, 258(5080):304-307.
- Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van Eldik L, Berry R, Vassar R.** (2006). Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci.*, 26(40):10129-10140.
- Oda Y.** (1999). Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol Int.*, 49(11):921-937.
- Orta-Salazar E, Aguilar-Vázquez A, Martínez-Coria H, Luquín-De Anda S, Rivera-Cervantes M, Beas-Zarate C, Feria-Velasco A, Díaz-Cintra S.** (2014). REST/NRSF-induced changes of ChAT protein expression in the neocortex and hippocampus of the 3xTg-AD mouse model for Alzheimer's disease. *Life Sci.*, 116(2):83-89.
- Ovsepian SV, Herms J.** (2013). Drain of the brain: low-affinity p75 neurotrophin receptor affords a molecular sink for clearance of cortical amyloid β by the cholinergic modulator system. *Neurobiol Aging*, 34(11):2517-2524.
- Park D, Lee HJ, Joo SS, Bae DK, Yang G, Yang YH, Lim I, Matsuo A, Tooyama I, Kim YB, Kim SU.** (2012). Human neural stem cells over-expressing choline acetyltransferase restore cognition in rat model of cognitive dysfunction. *Exp Neurol.*, 234(2):521-526.
- Pedersen WA, Guo Q, Hartman BK, Mattson MP.** (1997). Nerve growth factor-independent reduction in choline acetyltransferase activity in PC12 cells expressing mutant presenilin-1. *J Biol Chem.*, 272(36):22397-22400.
- Perez SE, Dar S, Ikonovic MD, DeKosky ST, Mufson EJ.** (2007). Cholinergic forebrain degeneration in the APPswe/PS1DeltaE9 transgenic mouse. *Neurobiol Dis.*, 28(1):3-15.
- Perez SE, He B, Muhammad N, Oh KJ, Fahnstock M, Ikonovic MD, Mufson EJ.** (2011). Cholinergic basal forebrain system alterations in 3xTg-AD transgenic mice. *Neurobiol Dis.*, 41(2):338-352.
- Perry EK, Tomlinson BE, Blessed G, Perry RH, Cross AJ, Crow TT.** (1981). Noradrenergic and cholinergic systems in senile dementia of Alzheimer type. *Lancet*, 2(8238):149.
- Pettit DL, Shao Z, Yakel JL.** (2001). beta-Amyloid(1-42) peptide directly modulates nicotinic receptors in the rat hippocampal slice. *J Neurosci.*, 21(1):RC120.
- Pigino G, Pelsman A, Mori H, Busciglio J.** (2001). Presenilin-1 mutations reduce cytoskeletal association, deregulate neurite growth, and potentiate neuronal dystrophy and tau phosphorylation. *J Neurosci.*, 21(3):834-842.
- Pigino G, Morfini G, Pelsman A, Mattson MP, Brady ST, Busciglio J.** (2003). Alzheimer's presenilin 1 mutations impair kinesin-based axonal transport. *J Neurosci.*, 23(11):4499-4508.
- Pimplikar SW, Nixon RA, Robakis NK, Shen J, Tsai LH.** (2010). Amyloid-independent mechanisms in Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci.*, 30(45):14946-14954.
- Power AE, Vazdarjanova A, McLaugh JL.** (2003). Muscarinic cholinergic influences in memory consolidation. *Neurobiol Learn Mem.*, 80(3):178-193.
- Pratt KG, Zhu P, Watari H, Cook DG, Sullivan JM.** (2011). A novel role for γ -secretase: selective regulation of spontaneous neurotransmitter release from hippocampal neurons. *J Neurosci.*, 31(3):899-906.

- Querfurth HW, LaFerla FM.** (2010). Alzheimer's disease. *N Engl J Med.*, 362:329e344
- Ramos B, Baglietto-Vargas D, del Rio JC, Moreno-Gonzalez I, Santa-Maria C, Jimenez S, Caballero C, Lopez-Tellez JF, Khan ZU, Ruano D, Gutierrez A, Vitorica J.** (2006). Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1xAPP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 27(11):1658-1672.
- Ramos-Rodriguez JJ, Pacheco-Herrero M, Thyssen D, Murillo-Carretero MI, Berrocoso E, Spires-Jones TL, Bacskai BJ, Garcia-Alloza M.** (2013). Rapid β -amyloid deposition and cognitive impairment after cholinergic denervation in APP/PS1 mice. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 72(4):272-285.
- Rasmusson DD.** (2000). The role of acetylcholine in cortical synaptic plasticity. *Behav Brain Res.*, 115(2):205-218.
- Riascos D, de Leon D, Baker-Nigh A, Nicholas A, Yukhananov R, Bu J, Wu CK, Geula C.** (2011). Age-related loss of calcium buffering and selective neuronal vulnerability in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*, 122: 565-576.
- Riascos D, Nicholas A, Samaeekia R, Yukhananov R, Mesulam MM, Bigio EH, Weintraub S, Guo L, Geula C.** (2014). Alterations of Ca^{2+} -responsive proteins within cholinergic neurons in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 35(6):1325-1333.
- Robertson RT, Baratta J, Yu J, LaFerla FM.** (2009). Amyloid-beta expression in retrosplenial cortex of triple transgenic mice: relationship to cholinergic axonal afferents from medial septum. *Neuroscience*, 164(3):1334-1346.
- Ryman DC, Acosta-Baena N, Aisen PS, Bird T, Danek A, Fox NC, Goate A, Frommelt P, Ghetti B, Langbaum JB, Lopera F, Martins R, Masters CL, Mayeux RP, McDade E, Moreno S, Reiman EM, Ringman JM, Salloway S, Schofield PR, Sperling R, Tariot PN, Xiong C, Morris JC, Bateman RJ; Dominantly Inherited Alzheimer Network.** (2014). Symptom onset in autosomal dominant Alzheimer disease: a systematic review and meta-analysis. *Neurology*, 83(3):253-260.
- Sanchez-Varo R, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, De Castro V, Jimenez S, Ruano D, Vizuete M, Davila JC, Garcia-Verdugo JM, Jimenez AJ, Vitorica J, Gutierrez A.** (2012). Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer's mice hippocampus. *Acta Neuropathol.*, 123(1):53-70.
- Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, Medina DL, Valenza M, Gennarino VA, Di Malta C, Donaudy F, Embrione V, Polishchuk RS, Banfi S, Parenti G, Cattaneo E, Ballabio A.** (2009). A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science*, 325(5939):473-477.
- Sarter M, Bruno JP.** (2000). Cortical cholinergic inputs mediating arousal, attentional processing and dreaming: differential afferent regulation of the basal forebrain by telencephalic and brainstem afferents. *Neuroscience*, 95(4):933-952.
- Sarter M, Bruno JP, Givens B.** (2003). Attentional functions of cortical cholinergic inputs: what does it mean for learning and memory? *Neurobiol Learn Mem.*, 80(3):245-256.
- Sassin I, Schultz C, Thal DR, Rüb U, Arai K, Braak E, Braak H.** (2000). Evolution of Alzheimer's disease-related cytoskeletal changes in the basal nucleus of Meynert. *Acta Neuropathol.*, 100(3):259-269.
- Saura CA, Choi SY, Beglopoulos V, Malkani S, Zhang D, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S, Kelleher RJ 3rd, Kandel ER, Duff K, Kirkwood A, Shen J.** (2004). Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. *Neuron*, 42(1):23-36.
- Schafer MK, Eiden LE, Weihe E.** (1998). Cholinergic neurons and terminal fields revealed by immunohistochemistry for the vesicular acetylcholine transporter. I. Central nervous system. *Neuroscience*, 84(2):331-359.
- Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad E, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Selkoe D, Younkin S.** (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med.*, 2(8):864-870.
- Schliebs R, Arendt T.** (2006). The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J Neural Transm.*, 113(11):1625-1644.
- Schliebs R, Arendt T.** (2011). The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res.*, 221(2):555-563.
- Selkoe DJ.** (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*, 298(5594):789-791.
- Semba K.** (2000). Multiple output pathways of the basal forebrain: organization, chemical heterogeneity, and roles in vigilance. *Behav Brain Res.*, 115(2):117-141.
- Seo H, Ferree AW, Isacson O.** (2002). Cortico-hippocampal APP and NGF levels are dynamically altered by cholinergic muscarinic antagonist or M1 agonist treatment in normal mice. *Eur J Neurosci.*, 15(3):498-506.

- Shearman MS, Ragan CI, Iversen LL.** (1994). Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of beta-amyloid-mediated cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(4):1470-1474.
- Shen J, Kelleher RJ 3rd.** (2007). The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(2):403-409.
- Shinoe T, Matsui M, Taketo MM, Manabe T.** (2005). Modulation of synaptic plasticity by physiological activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors in the mouse hippocampus. *J Neurosci.*, 25(48):11194-11200.
- Shytle RD, Mori T, Townsend K, Vendrame M, Sun N, Zeng J, Ehrhart J, Silver AA, Sanberg PR, Tan J.** (2004). Cholinergic modulation of microglial activation by alpha 7 nicotinic receptors. *J Neurochem.*, 89(2):337-343.
- Silveyra MX, Evin G, Montenegro MF, Vidal CJ, Martínez S, Culvenor JG, Sáez-Valero J.** (2008). Presenilin 1 interacts with acetylcholinesterase and alters its enzymatic activity and glycosylation. *Mol Cell Biol.*, 28(9):2908-2919.
- Smith IF, Hitt B, Green KN, Oddo S, LaFerla FM.** (2005). Enhanced caffeine-induced Ca²⁺ release in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurochem.*, 94(6):1711-18.
- Song W, Nadeau P, Yuan M, Yang X, Shen J, Yankner BA.** (1999). Proteolytic release and nuclear translocation of Notch-1 are induced by presenilin-1 and impaired by pathogenic presenilin-1 mutations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(12):6959-6963.
- Sorrentino P, Iuliano A, Polverino A, Jacini F, Sorrentino G.** (2014). The dark sides of amyloid in Alzheimer's disease pathogenesis. *FEBS Lett.*, 588(5):641-652.
- Stokin GB, Lillo C, Falzone TL, Brusch RG, Rockenstein E, Mount SL, Raman R, Davies P, Masliah E, Williams DS, Goldstein LS.** (2005). Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science*, 307(5713):1282-1288.
- Sun X, Beglopoulos V, Mattson MP, Shen J.** (2005). Hippocampal spatial memory impairments caused by the familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 M146V mutation. *Neurodegener Dis.*, 2(1):6-15.
- Sun S, Zhang H, Liu J, Popugaeva E, Xu NJ, Feske S, White CL 3rd, Bezprozvanny I.** (2014). Reduced synaptic STIM2 expression and impaired store-operated calcium entry cause destabilization of mature spines in mutant presenilin mice. *Neuron*, 82(1):79-93.
- Tabuchi K, Chen G, Südhof TC, Shen J.** (2009). Conditional forebrain inactivation of nicastrin causes progressive memory impairment and age-related neurodegeneration. *J Neurosci.*, 29(22):7290-7301.
- Takashima A, Murayama M, Murayama O, Kohno T, Honda T, Yasutake K, Nihonmatsu N, Mercken M, Yamaguchi H, Sugihara S, Wolozin B.** (1998). Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3beta and its substrate tau. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(16):9637-9641.
- Teipel SJ, Meindl T, Grinberg L, Grothe M, Cantero JL, Reiser MF, Möller HJ, Heinsen H, Hampel H.** (2011). The cholinergic system in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: an in vivo MRI and DTI study. *Hum Brain Mapp.*, 32(9):1349-1362.
- Torres M, Jimenez S, Sanchez-Varo R, Navarro V, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Carmona I, Davila JC, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J.** (2012). Defective lysosomal proteolysis and axonal transport are early pathogenic events that worsen with age leading to increased APP metabolism and synaptic Abeta in transgenic APP/PS1 hippocampus. *Mol Neurodegener.*, 7:59.
- Trujillo-Estrada L, Davila JC, Sanchez-Mejias E, Sanchez-Varo R, Gomez-Arboledas A, Vizuete M, Vitorica J, Gutierrez A.** (2014). Early neuronal loss and axonal/presynaptic damage is associated with accelerated amyloid- β accumulation in AbPP/PS1 Alzheimer's disease mice subiculum. *J Alzheimers Dis.*, 42:521-541.
- Tu H, Nelson O, Bezprozvanny A, Wang Z, Lee SF, Hao YH, Serneels L, De Strooper B, Yu G, Bezprozvanny I.** (2006). Presenilins form ER Ca²⁺ leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations. *Cell*, 126(5):981-993.
- Vana L, Kanaan NM, Ugwu IC, Wu J, Mufson EJ, Binder LI.** (2011). Progression of tau pathology in cholinergic Basal forebrain neurons in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Am J Pathol.*, 179(5):2533-2550.
- Vaucher E, Aumont N, Pearson D, Rowe W, Poirier J, Kar S.** (2001). Amyloid beta peptide levels and its effects on hippocampal acetylcholine release in aged, cognitively-impaired and -unimpaired rats. *J Chem Neuroanat.*, 21(4):323-329.
- Vaucher E, Fluit P, Chishti MA, Westaway D, Mount HT, Kar S.** (2002). Object recognition memory and cholinergic parameters in mice expressing human presenilin 1 transgenes. *Exp Neurol.*, 175(2):398-406.
- Verdier D, Dykes RW.** (2001). Long-term cholinergic enhancement of evoked potentials in rat hindlimb somatosensory cortex displays characteristics of long-term potentiation. *Exp Brain Res.*, 137(1):71-82.
- Wang R, Dineley KT, Sweatt JD, Zheng H.** (2004). Presenilin 1 familial Alzheimer's disease mutation leads to defective associative learning

- and impaired adult neurogenesis. *Neuroscience*, 126(2):305-312.
- Wang QJ, Ding Y, Kohtz DS, Mizushima N, Cristea IM, Rout MP, Chait BT, Zhong Y, Heintz N, Yue Z.** (2006). Induction of autophagy in axonal dystrophy and degeneration. *J Neurosci.*, 26(31):8057-8068.
- Wang Y, Greig NH, Yu QS, Mattson MP.** (2009). Presenilin-1 mutation impairs cholinergic modulation of synaptic plasticity and suppresses NMDA currents in hippocampus slices. *Neurobiol Aging*, 30(7):1061-1068.
- Watanabe T, Takasaki K, Yamagata N, Fujiwara M, Iwasaki K.** (2013). Facilitation of memory impairment and cholinergic disturbance in a mouse model of Alzheimer's disease by mild ischemic burden. *Neurosci Lett.*, 536:74-79.
- Watanabe H, Iqbal M, Zheng J, Wines-Samuelson M, Shen J.** (2014). Partial loss of presenilin impairs age-dependent neuronal survival in the cerebral cortex. *J Neurosci.*, 34(48):15912-15922.
- Wehl CC, Ghadge GD, Kennedy SG, Hay N, Miller RJ, Roos RP.** (1999). Mutant presenilin-1 induces apoptosis and downregulates Akt/PKB. *J Neurosci.*, 19(13):5360-5369.
- Weinberger NM.** (2003). The nucleus basalis and memory codes: auditory cortical plasticity and the induction of specific, associative behavioral memory. *Neurobiol Learn Mem.*, 80(3):268-284.
- Wenk GL, McGann K, Mencarelli A, Hauss-Wegrzyniak B, Del Soldato P, Fiorucci S.** (2000). Mechanisms to prevent the toxicity of chronic neuroinflammation on forebrain cholinergic neurons. *Eur J Pharmacol.*, 402(1-2):77-85.
- Wenk GL, McGann K, Hauss-Wegrzyniak B, Rosi S.** (2003). The toxicity of tumor necrosis factor-alpha upon cholinergic neurons within the nucleus basalis and the role of norepinephrine in the regulation of inflammation: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 121(3):719-29.
- Wenk GL, McGann-Gramling K, Hauss-Wegrzyniak B.** (2004). The presence of the APP(swe) mutation in mice does not increase the vulnerability of cholinergic basal forebrain neurons to neuroinflammation. *Neuroscience*, 125(3):769-776.
- Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR.** (1982). Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science*, 215(4537):1237-1239.
- Wilcock GK, Esiri MM, Bowen DM, Smith CC.** (1982). Alzheimer's disease. Correlation of cortical choline acetyltransferase activity with the severity of dementia and histological abnormalities. *J Neurol Sci.*, 57(2-3):407-417.
- Wines-Samuelson M, Schulte EC, Smith MJ, Aoki C, Liu X, Kelleher RJ 3rd, Shen J.** (2010). Characterization of age-dependent and progressive cortical neuronal degeneration in presenilin conditional mutant mice. *PLoS One*, 5(4):e10195.
- Wittenburg N, Eimer S, Lakowski B, Röhrig S, Rudolph C, Baumeister R.** (2000). Presenilin is required for proper morphology and function of neurons in *C. elegans*. *Nature*, 406(6793):306-309.
- Wong TP, Debeir T, Duff K, Cuello AC.** (1999). Reorganization of cholinergic terminals in the cerebral cortex and hippocampus in transgenic mice carrying mutated presenilin-1 and amyloid precursor protein transgenes. *J Neurosci.*, 19(7):2706-2716.
- Woodhouse A, Vickers JC, Adlard PA, Dickson TC.** (2009). Dystrophic neurites in TgCRND8 and Tg2576 mice mimic human pathological brain aging. *Neurobiol Aging*, 30(6):864-874.
- Wu J, Xie X.** (2006). Comparative sequence analysis reveals an intricate network among REST, CREB and miRNA in mediating neuronal gene expression. *Genome Biol.*, 7(9):R85.
- Wu B, Yamaguchi H, Lai FA, Shen J.** (2013). Presenilins regulate calcium homeostasis and presynaptic function via ryanodine receptors in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(37):15091-15096.
- Wu H, Williams J, Nathans J.** (2014). Complete morphologies of basal forebrain cholinergic neurons in the mouse. *Elife*, 3:e02444.
- Xia D, Watanabe H, Wu B, Lee SH, Li Y, Tsvetkov E, Bolshakov VY, Shen J, Kelleher RJ 3rd.** (2015). Presenilin-1 knockin mice reveal loss-of-function mechanism for familial Alzheimer's disease. *Neuron*, 85(5):967-981.
- Yamada K, Nabeshima T.** (2000). Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharmacol Ther.*, 88(2):93-113.
- Yan Z, Feng J.** (2004). Alzheimer's disease: interactions between cholinergic functions and beta-amyloid. *Curr Alzheimer Res.*, 1(4):241-248.
- Yankner BA.** (1996). Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron*, 16(5):921-932.
- Yu H, Saura CA, Choi SY, Sun LD, Yang X, Handler M, Kawarabayashi T, Younkin L, Fedeles B, Wilson MA, Younkin S, Kandel ER, Kirkwood A, Shen J.** (2001). APP processing and synaptic plasticity in presenilin-1 conditional knockout mice. *Neuron*, 31(5):713-726.
- Zahs KR, Ashe KH.** (2015). More than a FAD: the in vivo effects of disease-linked presenilin-1 mutations. *Neuron*, 85(5):893-895.
- Zhang C, Wu B, Beglopoulos V, Wines-Samuelson M, Zhang D, Dragatsis I, Südhof TC, Shen J.** (2009). Presenilins are essential for regulating neurotransmitter release. *Nature*, 460(7255):632-636.
- Zhang D, Zhang C, Ho A, Kirkwood A, Südhof TC, Shen J.** (2010). Inactivation of presenilins causes pre-synaptic impairment prior to post-

synaptic dysfunction. *J Neurochem.*, 115(5):1215-1221.

Zhang H, Liu J, Sun S, Pchitskaya E, Popugaeva E, Bezprozvanny I. (2015). Calcium signaling,

excitability, and synaptic plasticity defects in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.*, 45(2):561-580.

Trujillo-Estrada L, Jimenez S, De Castro V, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Navarro V, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Davila JC, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J. (2013). In vivo modification of Abeta plaque toxicity as a novel neuroprotective lithium-mediated therapy for Alzheimer's disease pathology. *Acta Neuropathol Commun.*, 12;1(1):73.

3.3.

In vivo modification of Abeta plaque toxicity as a novel neuroprotective lithium-mediated therapy for Alzheimer's disease pathology (ver Anexo 2)

INTRODUCTION

In Alzheimer's disease (AD), the abnormal accumulation of extracellular beta-amyloid (Abeta) plaques and intracellular hyperphosphorylated tau induces progressive synaptic alterations, axonal dystrophies, neuronal loss and the deterioration of cognitive capabilities of patients (Hardy y Selkoe, 2002; Wyss-Coray y Rogers, 2012). In spite to the relatively large information about the AD pathology, no effective disease-modifying treatment has been yet developed. Within the different compounds tested, lithium, a primary drug to treat bipolar disorder, has also been suggested as a potential treatment against AD (Nunes et al., 2007; Young, 2011; Forlenza et al., 2012; Diniz et al., 2013). In fact, clinical studies indicated that lithium could be preventive in patients with MCI, whereas no beneficial effects were observed in mild to moderate AD (Forlenza et al., 2012). In addition, epidemiological studies also reported a reducing risk of AD in patients with bipolar disorders treated with Li (Nunes et al., 2007). Thus, lithium may indeed constitute a useful preventive treatment for individuals at high risk of AD and/or preclinical stages of the disease.

The neuroprotective mechanisms of lithium are not completely understood. In AD models, lithium could reduce the AD pathology inhibiting (directly and/or indirectly) the activity of the tau kinase GSK-3 β . Whereas this inhibition would preclude tau phosphorylation (Bhat et al., 2004; Hernandez et al., 2013), dystrophy formation and neuronal degeneration (Jin et al., 2011; Leroy et al., 2012), the therapeutic benefits of this treatment have been questioned (Caccamo et al., 2007). On the other hand, lithium also mediated the inhibition of inositol monophosphatase and the induction of mTOR-independent autophagic process (Sarkar et al., 2005, 2006). This induction may be important in the prevention or attenuation of neurodegeneration associated with aggregated proteins. Moreover, since the accumulation of autophagic vesicles could also be implicated in the formation of axonal dystrophies in AD models (Nixon et al., 2005; Yu et al., 2005; Sanchez-Varo et al., 2012; Torres et al., 2012), lithium should alleviate the progression of these pathological features. However, while several studies have shown beneficial effects in lowering A β load (Phiel et al., 2003; Su et al., 2004; Toledo et al., 2009), others reported no effect or even increased A β production (Feyt et al., 2005; Caccamo et al., 2007; Sudduth et al., 2012).

The origin of these controversies is currently unknown. Among other factors, the different AD models, the different protocols of lithium administration or dosage and, perhaps more relevant, the partial neuropathology displayed for most of the AD models, could explain the discrepancies between the different effects of lithium treatment in transgenic models.

In this work we have evaluated the effect of chronic oral lithium treatment using the bigenic PS1M146L/APPSwe-London mice. This model displayed early degeneration of O-LM and HIPP interneurons (SOM/NPY-positive), in hippocampus and entorhinal cortex (Ramos et al., 2006; Moreno-Gonzalez et al., 2009). These GABAergic cells are implicated in memory/learning processes and degenerate in AD patients (Davies et al., 1980; Chan-Palay et al., 1985). Our data demonstrated that chronic (from 3- to 9-month-old) oral lithium administration, initiated before the onset of A β deposits, efficiently prevented most of the early neuropathological manifestations of our PS1/APP model. Lithium prevented the neuronal loss (at both hippocampus and entorhinal cortex), reduced the tau phosphorylation and the formation of axonal dystrophies and, in consequence, ameliorated behavioral/memory deficits observed at this age. These effects were mediated by increasing the compaction of A β plaques and lowering their toxic oligomeric halo. This modification on A β deposits toxicity is a novel disease-modifying effect of lithium, acting through the astrocytes and the release of heat shock proteins (Hsps).

RESULTS**3.3.1. Lithium treatment rescued behavioral/memory deficits**

First, we tested whether lithium administration was able to improve the behavioral/memory deficiencies observed in the 9 month-old control PS1/APP transgenic model. From the different tasks performed (i.e. Morris water maze), only open-field and novel object recognition showed statistical differences between PS1/APP and WT or PS1 control mice. No differences between WT and PS1 mice were observed.

In the open-field test, control PS1/APP mice displayed significant lower activity than either WT or PS1 mice (Figure 3.3.1). There was a significant reduction in both total distance (A) and velocity (B). No significant differences were observed in time in the periphery or center of the field, or in the immobility periods (data not shown). Also, no differences between PS1/APP and control groups were observed in fecal boli depositions (not shown). Thus, the PS1/APP mice were hypoactive as reported in other AD models, such as the 3xTg-AD (Filali et al., 2012). As we shown, this mild form of apathy in PS1/APP mice was totally relieved after lithium treatment (Fig. 3.3.1A-B).

We next evaluated the episodic-like memory using novel object recognition tests (Fig. 3.3.2). These tests are based on the preference for the “old familiar object” over the “recent familiar” object and the preference for a novel location (Davis et al., 2013). Although no differences between groups were observed in the object recognition ratio (Fig. 3.3.2A), control PS1/APP mice displayed a significant cognitive deficit in object location memory (which is hippocampus-dependent), compared with PS1/WT mice (Fig. 3.3.2B). Remarkably, full recovery of this spatial memory impairment was observed in lithium-treated PS1/APP mice, which displayed no differences with the control groups (Fig. 3.3.2B). Therefore, these data indicated that early oral lithium administration prevents the spatial memory deterioration in PS1/APP mice.

3.3.2. Lithium administration prevented neuronal loss

As we have reported previously, early Abeta deposition in this PS1/APP model is paralleled by a selective and significant decrease in the number of SOM and NPY positive GABAergic neurons in the hippocampal formation and the entorhinal cortex (Ramos et al., 2006; Moreno-Gonzalez et al., 2009; see also Fig. 3.3.3A, B and C). Furthermore, SOM/NPY positive cells displayed a prominent axonal pathology (Fig. 3.3.4A), with multiple dystrophies (positive also for phospho-tau) that surrounded Abeta plaques (Fig. 3.3.4B). The early and extensive degenerative pathology of the GABAergic cells, including neuronal death, could be used as a surrogated marker to evaluate the neuroprotective effect of lithium at the initial stages of the disease.

Open-Field

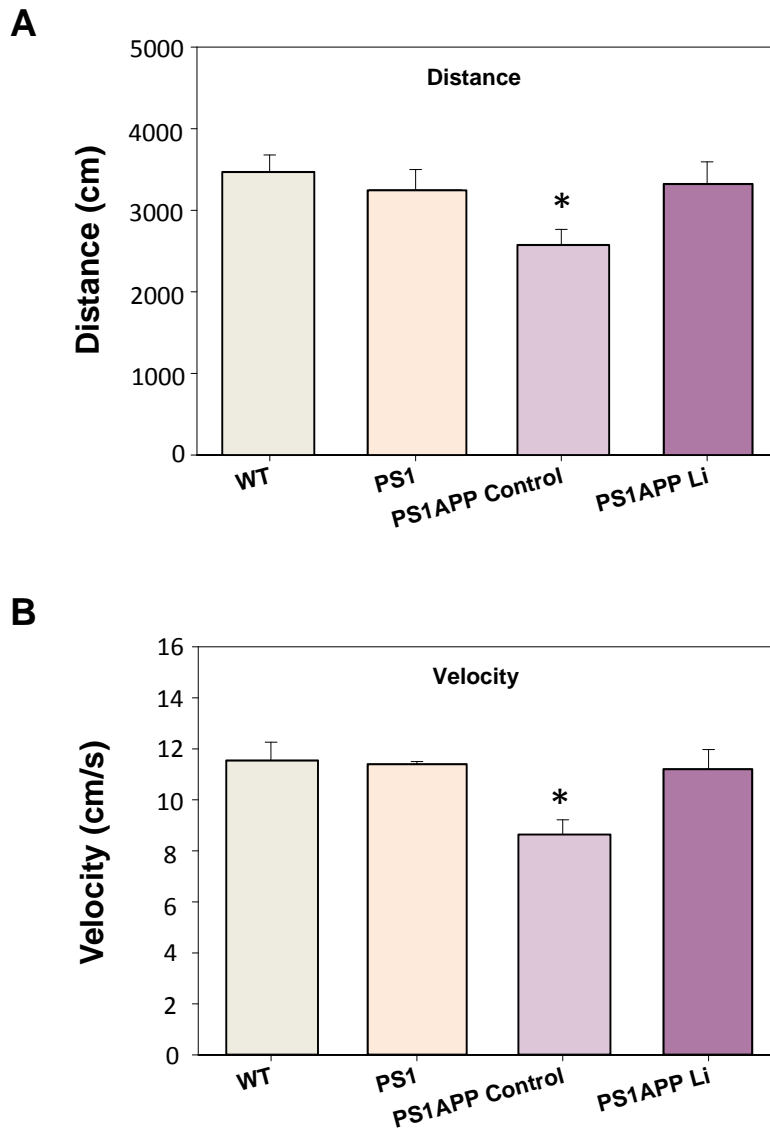
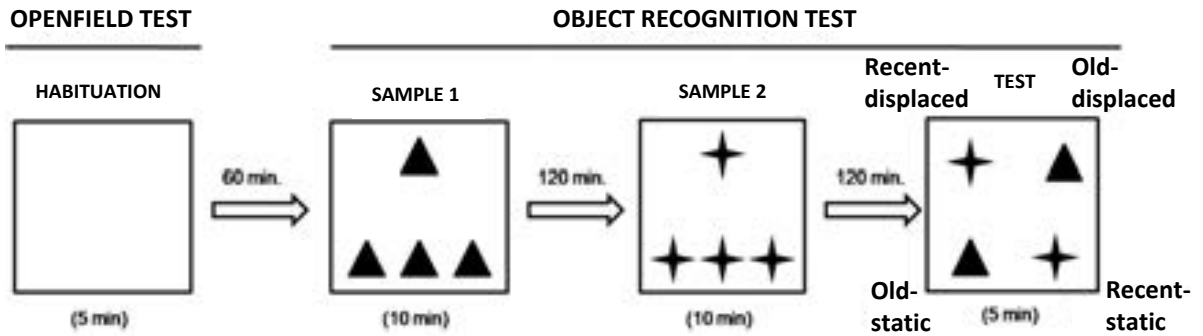
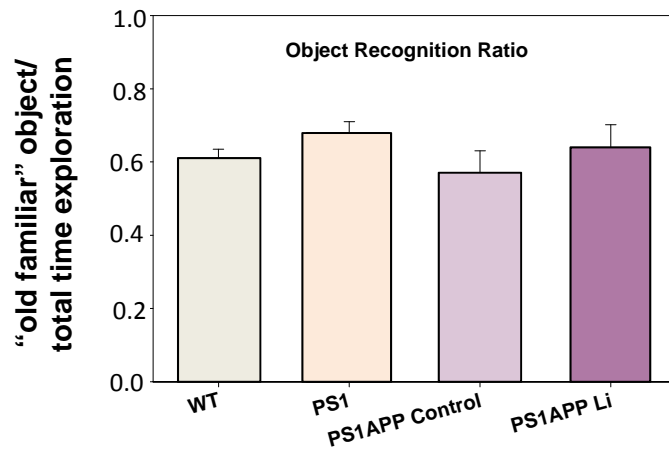


Figure 3.3.1. Lithium treatment improved the behavioral/memory deficiencies of PS1/APP mice. Open-field test. One-way ANOVA revealed significant differences between groups in both (A) distance ($F(3,24)=6.33$, $p=0.006$) and (B) velocity ($F(3,24)=8.02$, $p=0.002$). Tukey post-hoc analysis showed significant differences in PS1/APP control compared with WT/PS1 and PS1/APP lithium ($*p<0.05$).

A



B



C

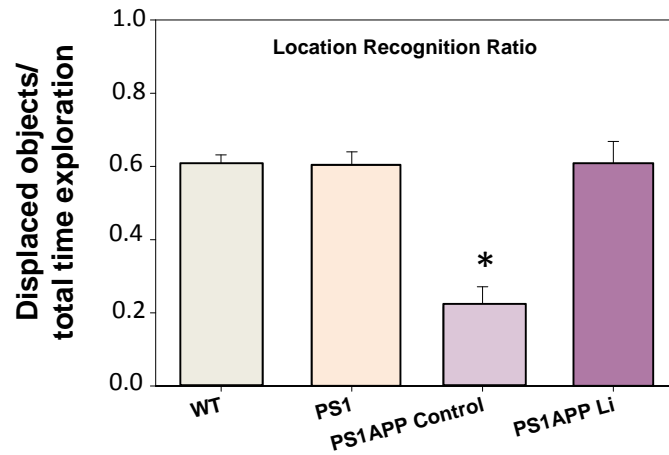


Figure 3.3.2. Lithium treatment improved the behavioral/memory deficiencies of PS1/APP mice. Behavioral protocol and memory measures. Sixty min after habituation to the open-field, animals received three samples trials with 120 min inter-trial as depicted. Each symbol (triangle and star) represents one type of object. One-way ANOVA $F(3,24)=21.15$, $p=0.0001$, followed by Tukey post-hoc multiple comparison test revealed significant differences between groups in place memory index. Post-hoc analysis showed significant difference in PS1/APP control compared with WT/PS1 controls and PS1/APP lithium ($*p<0.05$).

We thus analyzed, at the hippocampal formation, the SOM and NPY expression by qPCR; the number of SOM or NPY immunopositive somata, by stereological quantification, and their axonal dystrophy loading. Lithium produced an effective prevention of the neurodegenerative process exhibited by this neuronal population in PS1/APP mice (Fig. 3.3.3). In fact, the mRNA expression for both neuropeptides, SOM and NPY, was virtually identical in lithium-treated PS1/APP mice, as compared with control groups (Fig. 3.3.3A). Furthermore, stereological determination of the SOM or NPY cell number (Fig. 3.3.3B and C) further demonstrated the protective effect of lithium on these neurons in hippocampus proper (O-LM cells) and dentate gyrus (HIPP cells). PS1 and WT mice displayed not differences and lithium treatment of PS1 mice did not alter the expression of either SOM or NPY neuropeptides (see Fig. 3.3.3A) or the number of SOM or NPY positive cells (data in Fig. 3.3.3C were pooled from WT, PS1 control and lithium groups). For subsequent experiments, only PS1 control and PS1 lithium mice were included.

The same samples were used for the stereological quantification of SOM or NPY cell number at the entorhinal cortex, another early affected brain region. As previously reported (Moreno-Gonzalez et al., 2009), double transgenic mice displayed in this cortical region a significant decrease in the number of both SOM ($4,207 \pm 1,119$ cell/mm³, n=4, vs $8,596 \pm 803$ cell/mm³, n=6, for control PS1/APP and PS1 mice, respectively, $p < 0.05$; 52.2±13.1% of reduction) and NPY ($1,770 \pm 227$ cell/mm³, n=4, vs $3,062 \pm 363$ cell/mm³, n=6, for control PS1/APP and PS1 mice, respectively, $p < 0.05$; 58.4±7.1% of reduction) immunopositive GABAergic cells. However, after lithium treatment, the number of both neuronal populations did not differ between PS1/APP and PS1 groups ($7,087 \pm 1,097$ cell/mm³ or $3,003 \pm 423$ cell/mm³, n=4, for SOM and NPY, respectively; 17.6±12.8% or 1.9±13.8% of reduction).

Thus, early lithium intervention was highly effective preventing the SOM/NPY neuronal loss in both the hippocampal formation and the entorhinal cortex of PS1/APP model.

Another prominent pathological feature of this neuronal population in our PS1/APP mice is the extensive development of axonal dystrophies associated to Abeta plaques (Sanchez-Varo et al., 2012) (Fig. 3.3.4). Importantly, lithium treatment produced, in parallel with the prevention of the SOM/NPY cell loss, a prominent reduction of the axonal dystrophy pathology in these cells. In fact, lithium treated PS1/APP mice displayed an obvious and highly significant decrease (−60.2%) in the NPY positive dystrophic area (Fig. 3.3.4A). Also, there was a decrease in the AT8- and SOM-positive dystrophies (Fig. 3.3.4B). Therefore, lithium avoided SOM/NPY neurodegeneration and improved the cell integrity, reducing the axonal degeneration of this highly vulnerable neuronal population.

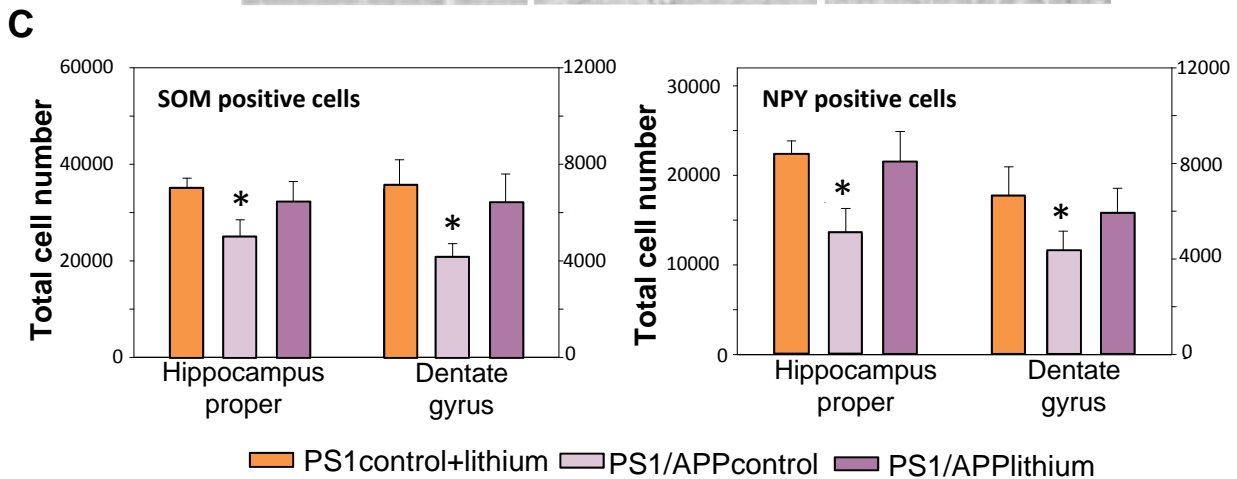
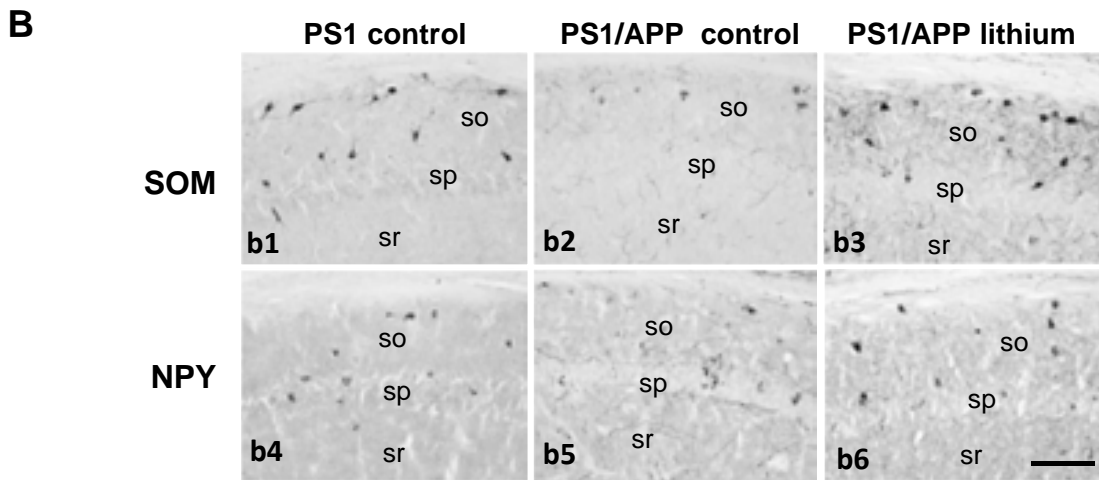
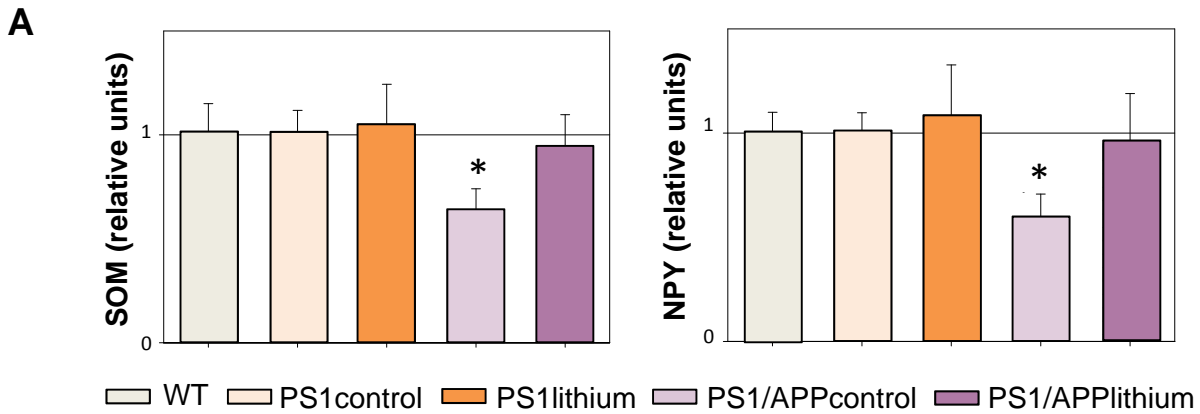


Figure 3.3.3. Lithium treatment avoided neuronal loss in the hippocampus of PS1/APP mice. (A) The expression of SOM and NPY ($n=20$ mice per group) was significantly lower in PS1/APP control group (ANOVA $F(4,96)=49.63$, $p=0.00001$ and $F(4,96)=27.24$, $p=0.0001$, for SOM and NPY respectively, post-hoc Tukey $*p<0.05$). WT, PS1 (control or lithium) and PS1/APP lithium displayed no differences. (B) SOM (b1-b3) or NPY (b4-b6) immunolabeled sections through CA1 subfield of PS1 control or PS1/APP control and lithium groups. (C) Total SOM or NPY cell number in hippocampus proper and dentate gyrus was assessed by stereology ($n=5$ per genotype and treatment). WT and PS1 groups displayed no differences and data were pooled. Only control PS1/APP displayed a significant reduction in SOM (ANOVA $F(2,22)=14.57$, $p=0.00002$ or $F(2,22)=11.84$, $p=0.0008$ for hippocampus proper and dentate gyrus, respectively) and NPY (ANOVA $F(2,22)=17.02$, $p=0.0001$ or $F(2,22)=6.87$, $p=0.008$ for hippocampus proper and dentate gyrus, respectively) cell number, followed by Tukey post-hoc multiple comparison test $*p<0.05$. Scale bars: b1-b6, 100 μm . so, stratum oriens; sp, stratum pyramidale; sr, stratum radiatum.

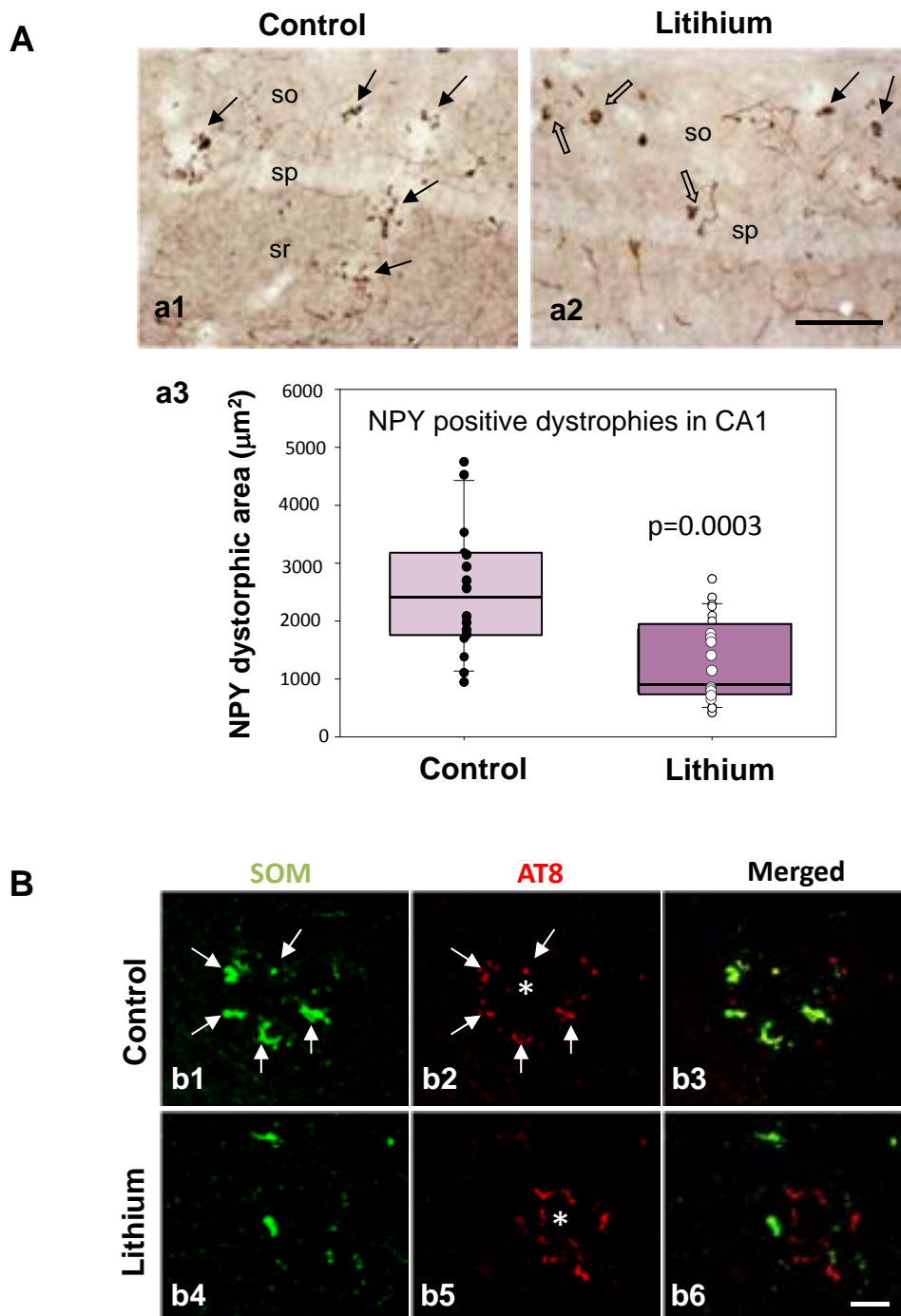


Figure 3.3.4. Lithium treatment reduced dystrophic pathology in the hippocampus of PS1/APP mice. A) NPY-positive dystrophies (black arrows) in CA1 subfield of PS1/APP control (a1) and lithium mice (a2) (open arrows: NPY cell bodies). (a3) Quantitative analysis (n=4 mice per group; 6 sections per animal) demonstrated the existence of a significant reduction of NPY-positive dystrophic area (μm^2) in PS1/APP lithium. B) Co-localization of SOM (green) and AT8 (red) in dystrophies assessed using confocal microscopy. In PS1/APP control mice (b1 to b3), SOM positive dystrophies (arrows), surrounding Abeta plaque (asterisk), were positive for AT8. Lithium produced a reduction in both SOM (b4) and AT8 (b5) positive dystrophies and in the co-localization between SOM and AT8 in dystrophies (b6). Scale bars: a1 and a2, 100 μm ; b1-b6, 20 μm . so, *stratum oriens*; sp, *stratum pyramidale*; sr, *stratum radiatum*.

3.3.3. Lithium treatment ameliorated axonal/synaptic pathology by reducing abnormal intracellular protein accumulation

PS1/APP mice accumulated phospho-tau, LC3-II and ubiquitinated proteins in axonal dystrophies surrounding Abeta plaques (Fig. 3.3.5-3.3.6; see also Sanchez-Varo et al., 2012; Torres et al., 2012). Thus, in agreement with the preservation of SOM/NPY neurons, lithium also reduced both the total AT8-positive phospho-tau levels, determined by western blots (Fig. 3.3.5A), and the AT8-positive dystrophies, detected by immunohistochemistry (Fig. 3.3.5B). Furthermore, lithium also reduced the steady-state levels of both LC3-II and ubiquitinated proteins (see Fig. 3.3.6A). In fact, the steady-state levels of both LC3-II and ubiquitinated proteins were similar to those observed in the PS1 lithium group. Immunohistochemistry also demonstrated a dramatic reduction in both ubiquitin- and LC3-positive dystrophies, surrounding the Abeta plaques (Fig. 3.3.6B). Thus, lithium reduced the number of dystrophies and the accumulation of intracellular proteins.

This lithium-mediated reduction of the axonal dystrophic pathology could also ameliorate the synaptic degeneration. Thus, we determined (by western blots) the levels of the classic presynaptic marker synaptophysin (not shown). Control PS1/APP mice displayed a consistent and significant reduction (0.72 ± 0.12 vs 1.00 ± 0.14 for PS1/APP and PS1 control, respectively, $n=7$ per phenotype, Tukey $p < 0.05$) whereas a completely recovery was detected in lithium-treated PS1/APP mice (0.96 ± 0.16 for PS1/APP lithium, $n=9$).

Taken together, these data indicated that the chronic lithium treatment markedly reduced the plaque associated axonal dystrophy pathology, in parallel with a reduction on the abnormal intracellular accumulation of proteins and/or autophagic vesicles, in this PS1/APP model. Furthermore, lithium also decreased the putative presynaptic degeneration observed in this transgenic mouse model.

3.3.4. Lithium treatment substantially modified the morphology and toxicity of the extracellular Abeta plaques

Next, we tested whether lithium treatment could alter Abeta accumulation in PS1/APP hippocampus. Data (Table 3.3.1) indicated the absence of modifications on either i) total monomeric Abeta (quantified by western blot and 6E10 antibody), ii) soluble Abeta42 (quantified by ELISA using soluble extracts) or iii) Abeta plaque load (determined using either anti-Abeta42 or 6E10 antibodies). However, we did observe a highly significant reduction (-62.7%) in the size of the Abeta plaques in lithium-treated PS1/APP mice, as compared with PS1/APP control group (Fig. 3.3.7A and quantitatively in b1). In fact, when the distribution of the different sizes of the Abeta plaques was analyzed (Fig. 3.3.7b2), the treated group displayed a marked increase (4 fold) in the number of small plaques ($< 200 \mu\text{m}^2$), with the consequent reduction in the number of

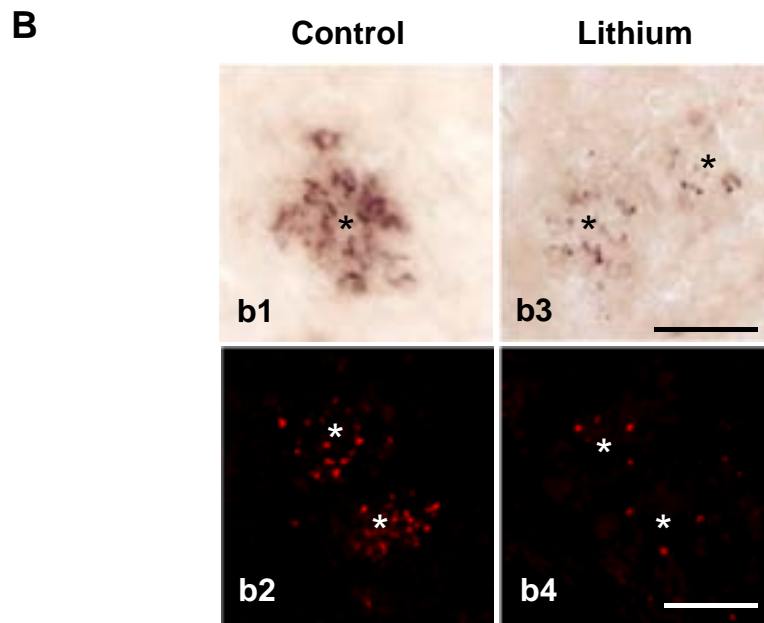
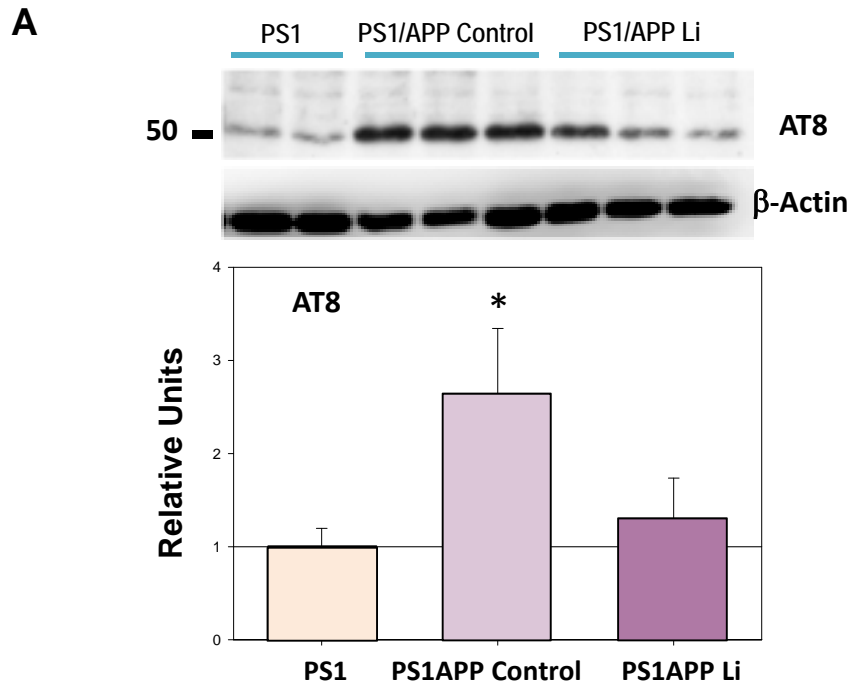


Figure 3.3.5. Lithium treatment reduced the dystrophic pathology associated to Abeta plaques.
 A) Representative western blot (n=7 mice per group) and quantitative analysis of phosphorylated tau, determined using AT8 clone, of total proteins from PS1 control, PS1/APP control and PS1/APP lithium-treated mice. For quantification, the AT8 levels were referred to PS1 control group. The AT8 levels were significantly increased in PS1/APP control mice (ANOVA $F(2,18)=22.66$, $p=0.0001$; Tukey $*p<0.05$) whereas PS1 control and PS1/APP lithium displayed no differences. B) Representative AT8 positive dystrophies surrounding Abeta plaques from control (b1 and b2) or lithium treated (b3 and b4) PS1/APP mice. Scale bars: b1 and b3, 50 μm ; b2 and b4, 100 μm .

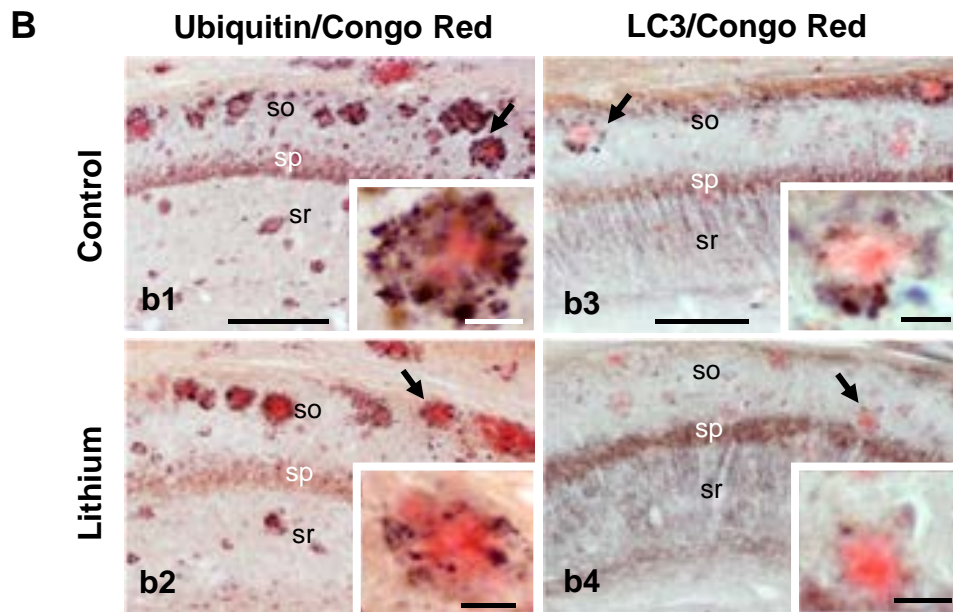
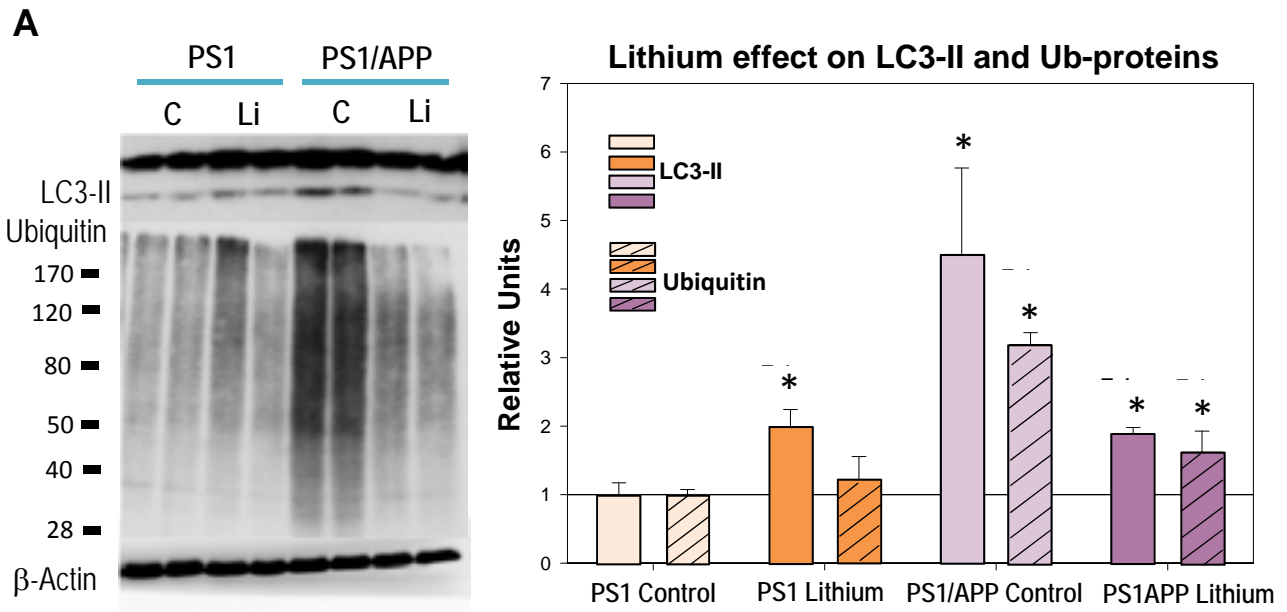


Figure 3.3.6. Lithium treatment reduced the dystrophic pathology associated to Abeta plaques. A) Representative western blots and quantitative analysis of steady-state levels of LC3-II and ubiquitinated proteins in PS1 and PS1/APP control and treated mice (n=4 per genotype and treatment). A clear and significant accumulation of both LC3-II (ANOVA $F(3,12)=32.52$, $p=0.001$) and ubiquitinated proteins (ANOVA ($F(3,12)=63.67$, $p=0.00001$)) was observed in PS1/APP control mice. Lithium treatment reversed this pathology. The post-hoc analysis, using Tukey test $*p<0.05$, was indicated in the figure. B) Ubiquitin (b1 and b2) and LC3 (b3 and b4) immunolabeled hippocampal sections (counterstained with Congo red for Abeta plaques) of control and lithium treated PS1/APP mice corroborated the accumulation of both markers, associated with dystrophic neurites surrounding amyloid plaques (b1 and b3) and the patent lithium reduction (b2 and b4) in the presence of ubiquitin and LC3 positive dystrophies. Inserts in b1-b4 showed higher magnification details of the dystrophies surrounding Abeta plaques. Scale bars: b1 to b4, 200 μ m; insets, 25 μ m. so, *stratum oriens*; sp, *stratum pyramidale*; sr, *stratum radiatum*.

medium and large size Abeta plaques.

Table 3.3.1. Abeta accumulation was not modified in the lithium treated PS1/APP mice. Data are mean±SD.

		Control	Lithium
Soluble Abeta42 (pg/ml)	ELISA	27.57±10.74 n = 7	30.14±6.47 n = 7
Total Abeta (relative units)	Western blots 6E10	1.0±0.26 n = 18	0.98±0.60 n = 25
Abeta load (% of area)	Immunohistochemistry 6E10	6.83±1.99 n = 5	4.40±1.81 n = 5
Abeta42 load (% of area)	Immunohistochemistry Abeta42	5.09±2.31 n = 5	3.65±1.03 n = 5

This reduction of plaque size, in absence of a parallel reduction on the total Abeta deposition, could arise of a higher Abeta compaction. Interestingly, higher plaque compaction could reduce the Abeta pathology (Cohen et al., 2009). We thus determined the plaque compaction by quantifying the optical density of Abeta42 immunostained plaques, randomly selected by the stereological microscope (n=800 plaques from 5 different sections and 6 different control or treated mice; see Cohen et al., 2009). Although the plaque compaction was heterogeneous in both groups (Figure 3.3.8A), our data demonstrated the existence of a highly increase (82%) in the plaque compaction (calculated as Pixels/ μm^2) in the lithium treated PS1/APP mice (Fig. 3.3.8B).

The increase in plaque compaction could involve a reduction of the putative toxic oligomeric Abeta that surrounded or aroused from plaques (the plaque “halo”; Koffie et al., 2009). To quantitatively determine this possibility, the Abeta plaques were first stained with Thioflavin S followed by immunostaining with the conformation-specific OC antibody, which recognizes fibrillar Abeta oligomers. Representative double labeled images, and the quantification of the plaque oligomeric halo, is shown in Fig. 3.3.9 (a1 to a6, and a7, respectively). As expected, lithium treatment produced a significant reduction of the OC-positive plaque halo which might result in less toxic plaques.

To examine the impact of lithium treatment on the toxicity of the Abeta plaques, we quantified the NPY dystrophic area and the corresponding Abeta area in individual plaques. Using unbiased stereological counts in NPY and 6E10 double immunostained sections (Fig. 3.3.10A), we first calculated the proportion of Abeta plaques devoid of NPY dystrophies. As shown, treated PS1/APP mice displayed a small, but significant, increase in the proportion of plaques without associated NPY dystrophies (Fig. 3.3.10B). More relevant, when the NPY dystrophic area was normalized by the corresponding Abeta plaque area, we observed a substantial reduction of the NPY dystrophic area per plaque in the treated PS1/APP mice (Fig. 3.3.10C). Since this reduction of the dystrophic area could just reflect the decrease in plaque size, we also plotted single NPY-dystrophic area versus the corresponding Abeta plaque area, for both control and treated PS1/APP mice. As

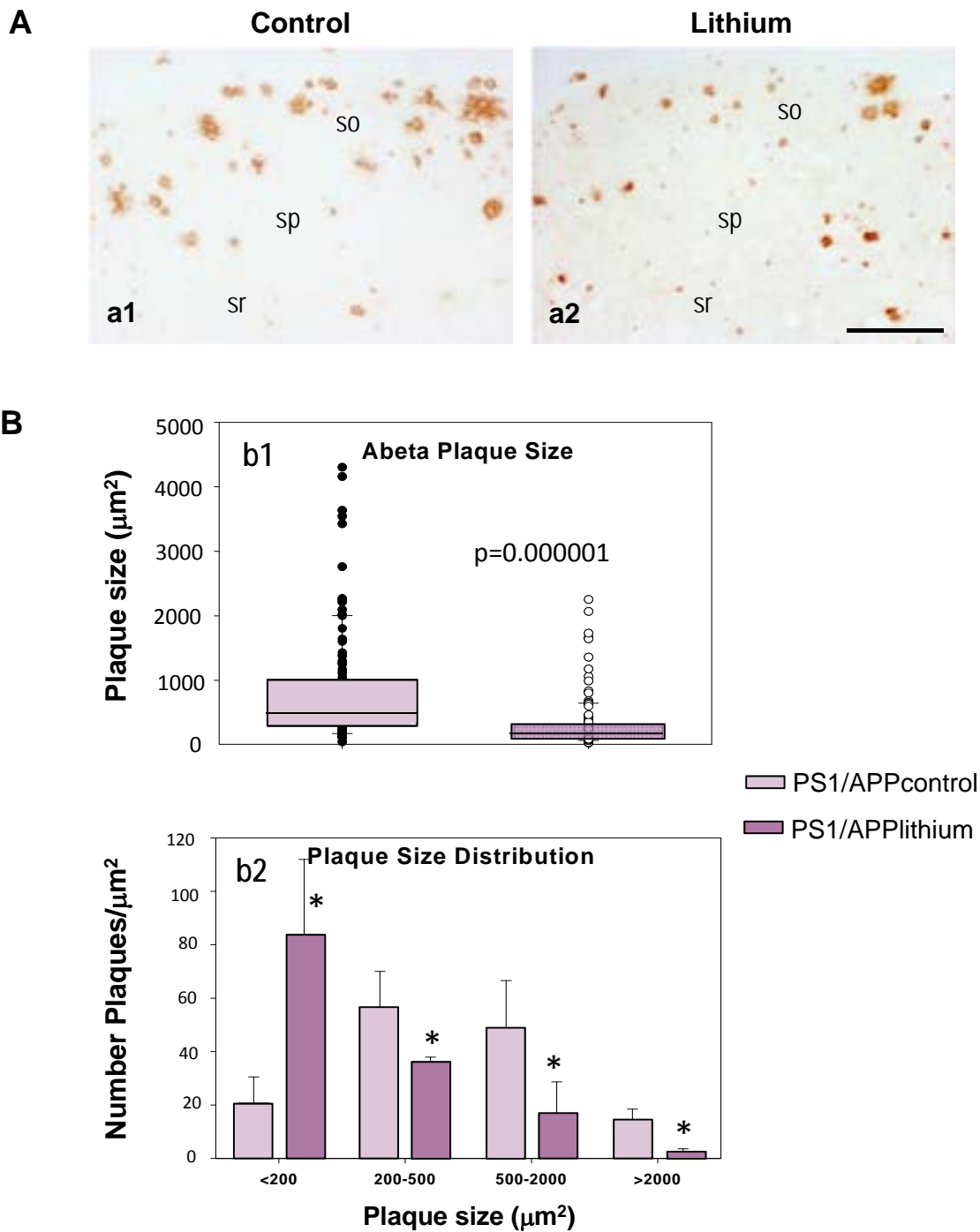


Figure 3.3.7. Lithium treatment reduced the size of the extracellular Abeta plaques. Lithium treatment reduced the size of Abeta deposits. Plaques were immunostained with anti-Abeta42 antibody. Representative images (a1 and a2) and quantitative analysis (b1 and b2) of Abeta plaque size from the CA1 subfield of control and lithium-treated PS1/APP mice. (b1) The individual plaque size (μm^2) was quantitatively assessed from 25 sections of 6 different control or lithium treated PS1/APP mice. (b2) The plaque size distribution was determined by calculating the number of plaques falling into distinct area categories (ranging from $<200 \mu\text{m}^2$ to $>2000 \mu\text{m}^2$). For each category, the difference between control and lithium was determined by t-test, $*p<0.05$. Scale bars: A, $200 \mu\text{m}$. so, *stratum oriens*; sp, *stratum pyramidale*; sr, *stratum radiatum*.

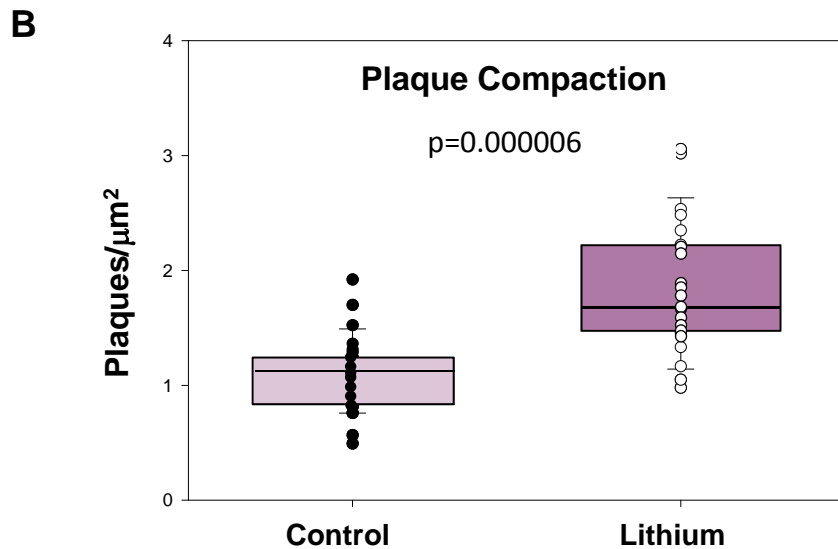
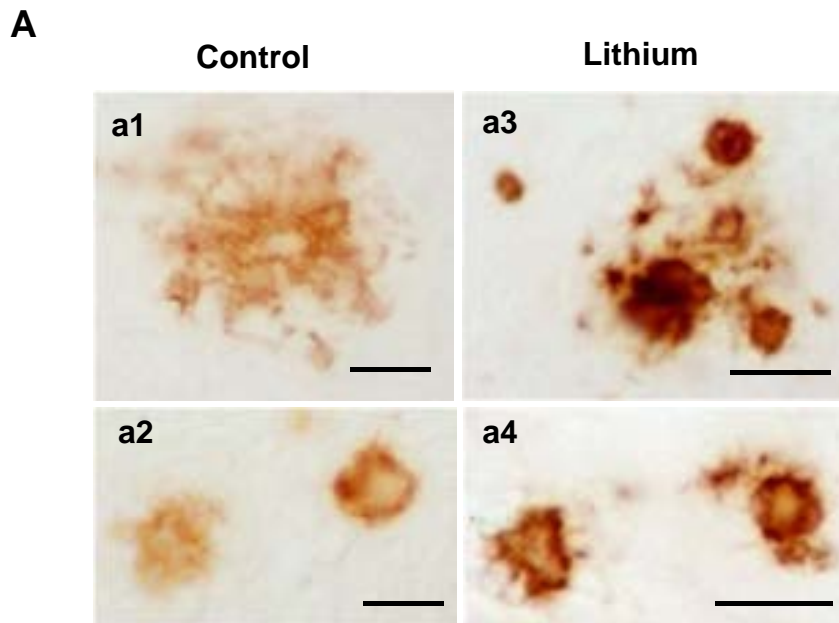


Figure 3.3.8. Lithium treatment increased the compaction of the extracellular Abeta plaques. A) Lithium treatment increased the Abeta plaque compaction. Signal density of Abeta42 immunostained plaques from control (a1, a2) and lithium-treated (a3, a4) mice were measured in the CA1 subfield of hippocampus. B) Optical densities (pixel/ μm^2) of plaques from 5 sections/mouse and 5 mice per group was represented in the graph. Scale bars: A, 25 μm .

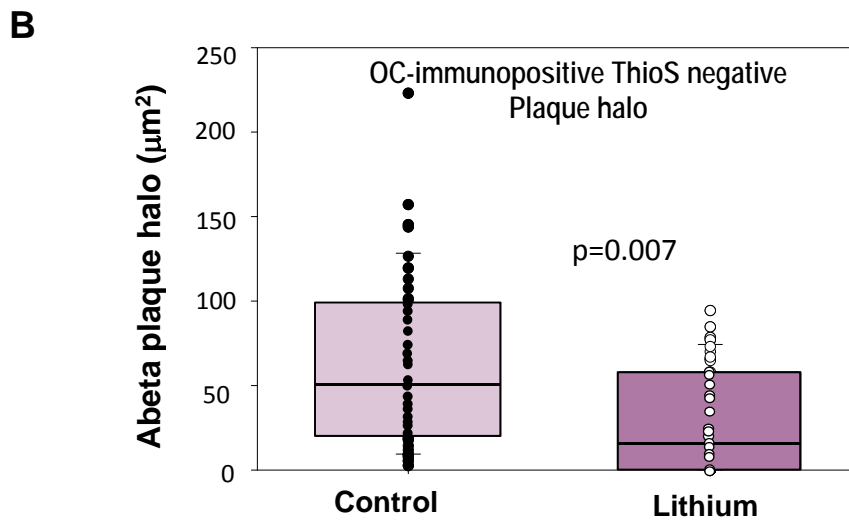
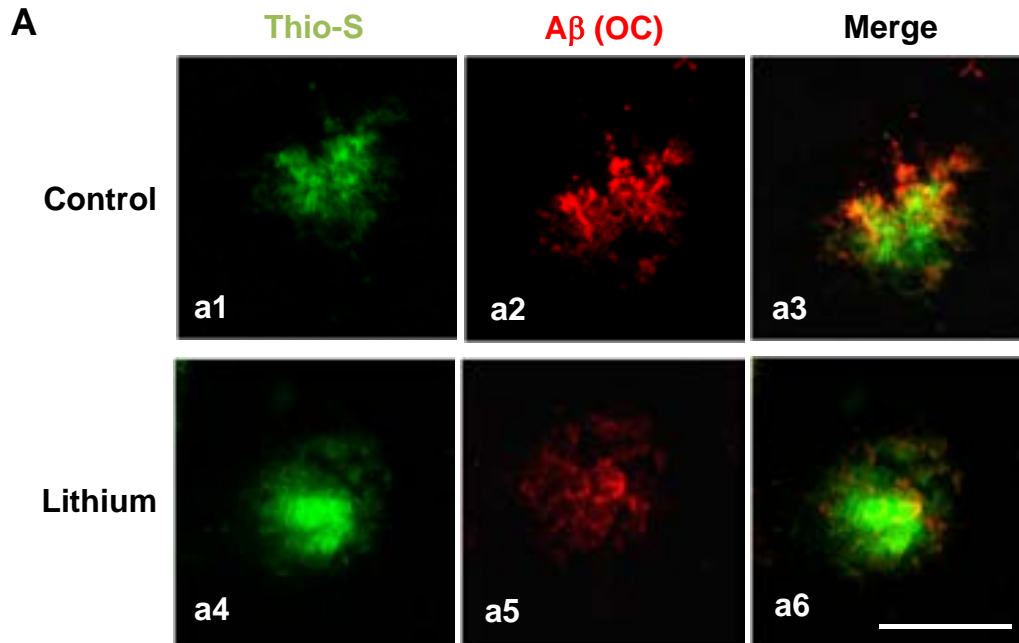


Figure 3.3.9. Lithium treatment reduced the oligomeric halo of the extracellular Abeta plaques. Plaque oligomeric halo, considered as the difference between OC- and Thio-S-stained areas was reduced by lithium. Plaques were sequentially staining with Thio-S and the OC antibody. (a1-a6) Representative images of a similar size plaque in the CA1 region of control (a1-a3) or lithium-treated (a4-a6) mice showing the plaque halo. (B) Similar size plaques (<200 μ m²) were analyzed (15 plaques per animal, n=3 mice per group). Scale bars: A, 20 μ m.

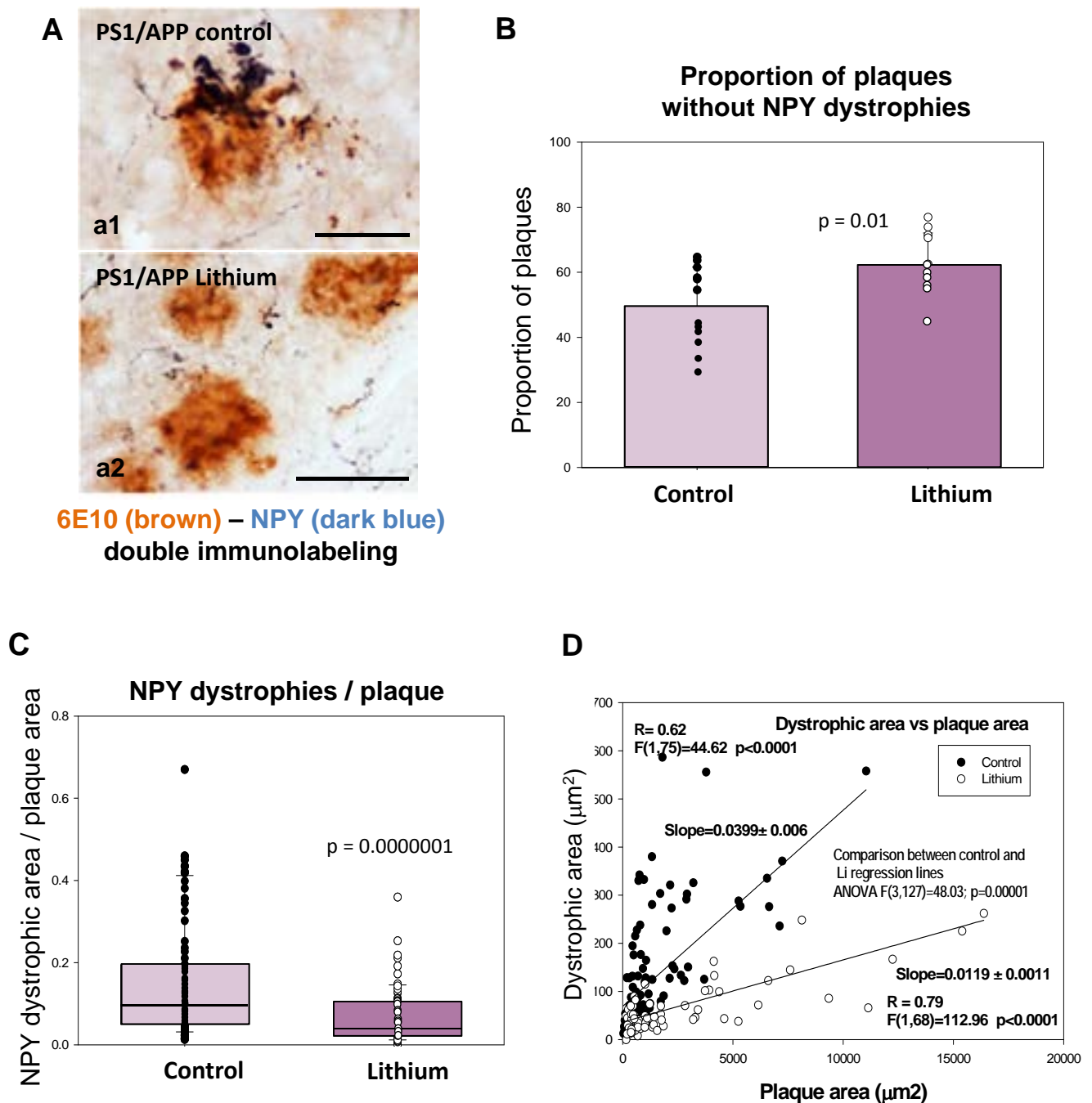


Figure 3.3.10. Lithium treatment decreased the Abeta toxicity. A) NPY-labeled dystrophic neurites, surrounding 6E10-labeled Abeta plaques, were compared in CA1 field of hippocampus from control (a1) and lithium-treated (a2) PS1/APP mice (5 sections per mice, 3 mice per group). B) Lithium treatment increased the proportion of Abeta plaques displaying no apparent NPY-dystrophies. The difference between groups (indicated in the figure) was assessed using t-test. C) Lithium also significantly (using non-parametric Wilcoxon test) reduced the NPY dystrophic area, normalized by the corresponding plaque area. D) The decrease on Abeta toxicity, at all plaque sizes, was also assessed by plotting the individual NPY dystrophic area versus Abeta plaque area. The individual data from both groups were fitted to a linear model and the possible difference between groups was analyzed using Multiple Regression Analysis. As shown, both groups (control and lithium) could be fitted to a linear model and both regression lines were statistically different (ANOVA F(3,145)= 38.00; p=0.00001). Furthermore, the slopes of the fitted data were also significantly different between both groups (Conditional Sum of Squares, see Results). Scale bars: a1, 25 µm; a2, 50 µm.

expected, we observed a significant positive linear correlation between both parameters in both mice groups (Fig. 3.3.10D). Importantly, we also observed a significant higher dystrophic area in control PS1/APP mice across all size of plaques, as compared with treated PS1/APP mice. In fact, the slope of the fitted linear regression, between dystrophic area versus plaque area, presented a 3-fold decrease after lithium treatment (0.0399 ± 0.006 vs 0.0119 ± 0.0011 ; for control and lithium PS1/APP mice; ANOVA $F(1,127)=27.88$, $p=0.00001$).

Taken together, these data demonstrated that lithium treatment modified Abeta plaques quality decreasing their toxicity measured as the capacity to induce axonal dystrophies formation.

3.3.5. Lithium treatment induced astrocyte activation and the incorporation of Hsps to Abeta plaques

Finally, we investigated the possible implication of astrocytes on this lithium-mediated modification of Abeta plaques. Activated astrocytes, surrounding Abeta, could highly influence the Abeta compaction and plaque aggregation (Yin et al., 2006; Ojha et al., 2011; Kraft et al., 2013). Thus, we evaluated whether lithium affected the astrocyte activation by determining the expression of GFAP by qPCR (Fig. 3.3.11A) and immunohistochemistry (Fig. 3.3.11B). As expected, GFAP expression and astrocyte activation were increased in control PS1/APP group (as compared with PS1 mice, Fig. 3.3.11A). As also shown, lithium treatment produced a higher increased in GFAP expression (Fig. 3.3.11A) and also in GFAP activation (compare Fig. 3.3.11B, b2 and b4). In fact, in the treated PS1/APP mice, astrocytes were more immunoreactive and clearly hypertrophic, as compared with control PS1/APP. However, no significant lithium-dependent differences were detected on the expression of other factors, such as NGF, GDNF, NT-5, MMP9, MMP3 or ApoE, (Fig. 3.3.11C). It is also noteworthy that lithium treatment has no effect on GFAP expression on non-Abeta activated astrocytes (PS1 lithium mice).

Within the different factors and/or processes that could influence Abeta compaction, it has been demonstrated that extracellular chaperones, such as heat shock proteins (Hsps), have the capacity to reduce the Abeta toxicity by increasing the sequestration/compaction of putative toxic Abeta oligomers (Hoshino et al., 2011; Ojha et al., 2011; Mannini et al., 2012; Narayan et al., 2012; Cascella et al., 2013). Furthermore, it has been also demonstrated that astrocytes could express and release different Hsps (Ojha et al., 2011). Thus, we evaluated whether lithium treatment did affect the Hsps expression. First, we determined, by western blots, the levels of Hsp27, Hsp60 and Hsp70 in PS1/APP control and lithium treated mice. As shown in Fig. 3.3.12A, we observed a consistent increase on the levels of all four proteins in the lithium group. However, no changes on expression (by qPCR) were detected (not shown). Moreover, we analyzed the *in vivo* localization of

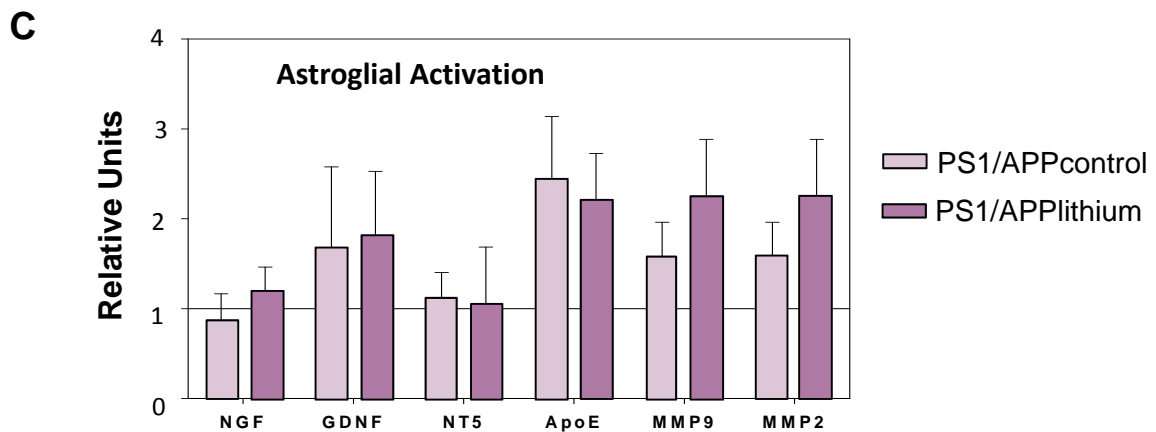
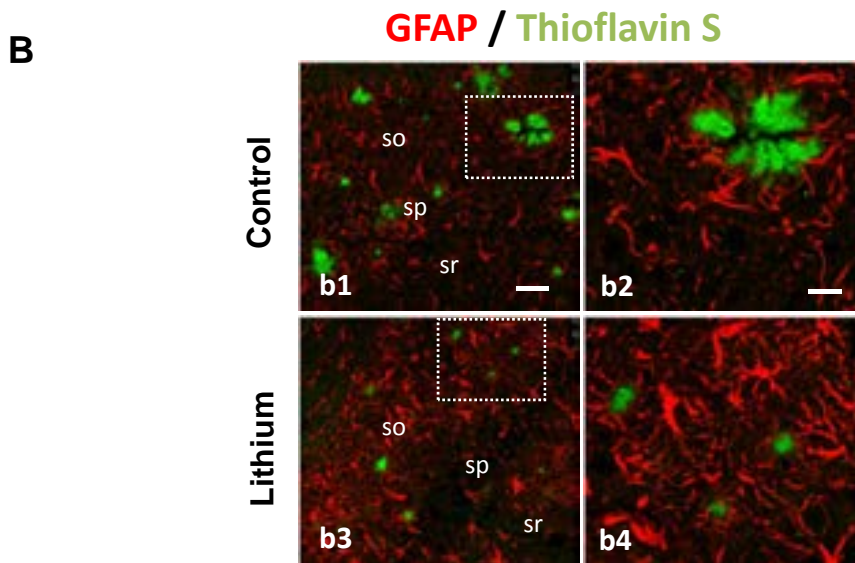
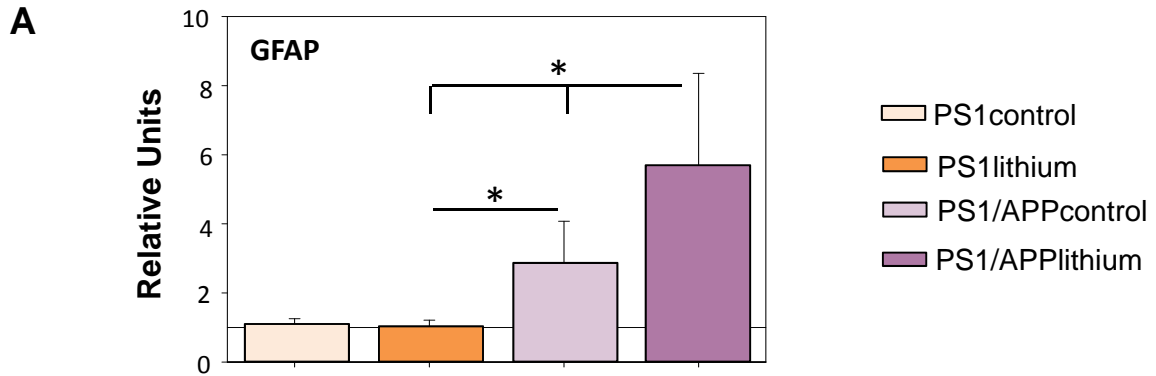


Figure 3.3.11. Lithium increased the astrocyte activation. A-B) Lithium treatment increased the astrocyte activation assessed by qPCR (A) and GFAP immunoreactivity (B). GFAP expression (A) was assayed in hippocampal samples from 10 mice per group. GFAP expression increased in PS1/APP control group and further increased in PS1/APP lithium-treated mice. ANOVA ($F(3,36)=18.82$, $p=0.0001$), Tukey post-hoc $*p<0.05$. B) Representative confocal images through the CA1 field of control (b1, b2) and lithium-treated (b3, b4) mice, showing GFAP-immunoreactive astrocytes (red) and Thioflavin-stained Abeta plaques (green). As shown, GFAP immunoreactivity is clearly higher in lithium-treated mice. C) Lithium did not modify the expression of NGF, GDNF, NT-5, MMP9, MMP3 or ApoE, determined by qPCR ($n=4$ mice per group). Scale bars: B, 20 μ m. so, *stratum oriens*; sp, *stratum pyramidale*; sr, *stratum radiatum*.

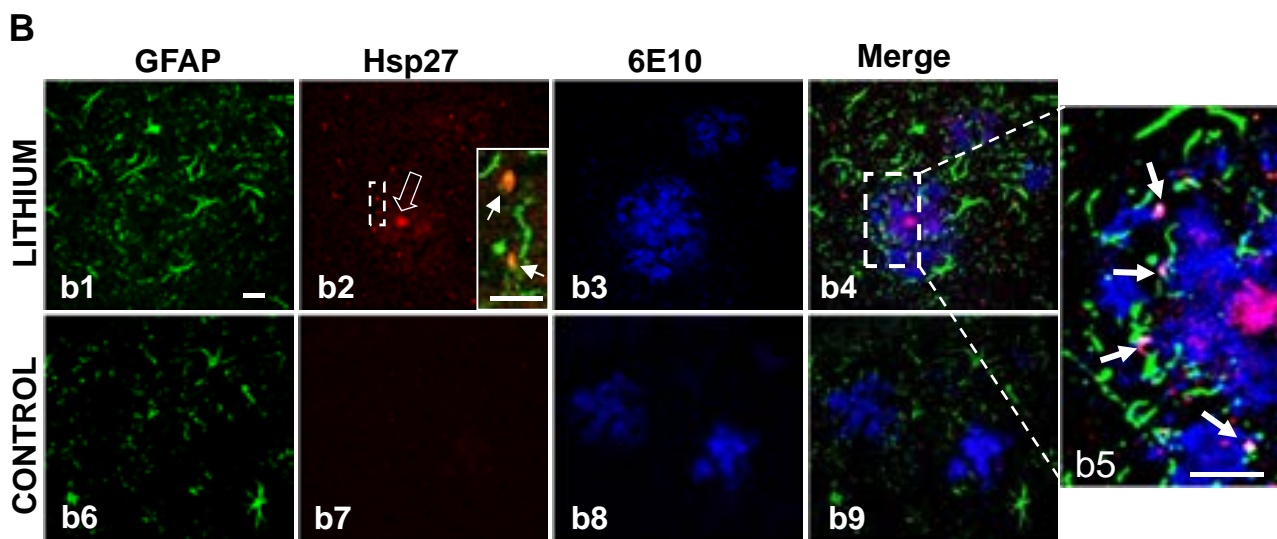
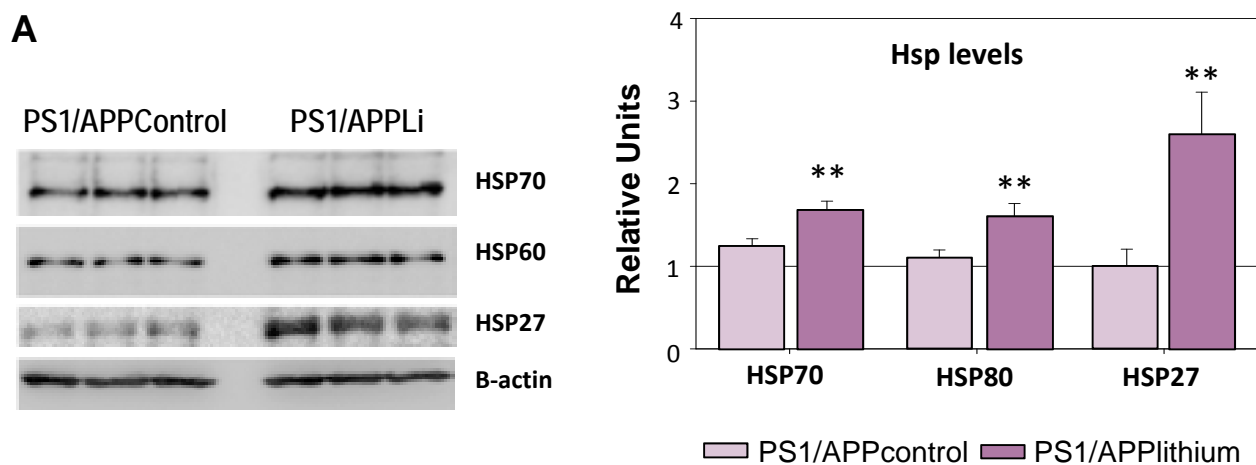


Figure 3.3.12. Lithium increased the astrocyte activation and the Hsps levels. A) Lithium treatment increased the levels of three Hsps (Hsp70, Hsp60 and Hsp27). Representative western blots and quantitative analysis of Hsps using protein extract from hippocampus of control and lithium-treated PS1xAPP mice (n=4 mice per group). The expression of all three Hsps was normalized using PS1 control (not shown), and the significance was determined by t-test, **p<0.01. B) Confocal images through the CA1 subfield showing GFAP/Hsp27/Abeta triple immunofluorescence labeling. In lithium-treated mice (b1-b5), the core of the Abeta plaques (labeled by 6E10, in blue) is intensely stained with the anti-Hsp27 antibody (in red), as well as astrocytic puncta processes (labeled by GFAP, in green) surrounding the plaques (see insert in b2 showing double GFAP-Hsp27 labeling, and the triple labeling detail in b5). On the contrary, in control mice (b6-b9), the core of the Abeta plaques appears almost devoid of Hsp27 immunostaining and low or no immunoreactivity was observed in astrocytes surrounding the plaques. Scale bars: b1-b9, 20 μ m; insert in b2, 10 μ m.

Hsp70 (not shown) and Hsp27 (Fig. 3.3.12B) and whether lithium treatment modified their distribution. Both chaperones displayed similar immunostaining patterns. In lithium treated PS1/APP mice (Fig. 3.3.12B, b1 to b5), triple labeling experiments demonstrated that anti-Hsp27 intensely stained the Abeta plaque core (labeled by 6E10) and, interestingly, also activated astrocytes (GFAP-positive cells) near plaques displayed Hsp-27 immunopositive puncta. However, in control PS1/APP mice, the core of Abeta plaques appeared weakly immunostained and low or no immunoreactivity was observed in astrocytes surrounding Abeta plaques (Fig. 3.3.12B, b6-b9).

Although more experiments are clearly needed, these data indicated that lithium, modulating the production/release of Hsps by astrocytes, might decrease the toxicity of plaques by increasing the Abeta compaction.

DISCUSSION

Here, we demonstrate that chronic oral administration of lithium, before the pathology onset resulted in less toxic plaque formation that significantly ameliorated the degenerative processes and behavioral/memory deficits occurring during disease progression in our PS1/APP model. Specifically, and of great relevance for AD prevention, early lithium intervention was able to arrest neuronal loss in hippocampus and entorhinal cortex of highly vulnerable populations. Besides, lithium substantially reduced the axonal dystrophic pathology, associated to amyloid plaques, by increasing the Abeta compaction. As we discuss below, these neuroprotective effects of lithium could be mediated by modifications of the plaque toxicity through the astrocytic release of heat shock proteins. On contrary to previous failed clinical studies using lithium, our results highlight the potential use of this compound as a preventive intervention to halt/slow AD pathology progression at preclinical stages.

As we reported previously, our PS1/APP mouse displays early (6 months) neuronal loss affecting SOM/NPY GABAergic cells in the hippocampal formation and entorhinal cortex, which coincides spatiotemporally with the extracellular Abeta deposition (Ramos et al., 2006; Jimenez et al., 2008; Moreno-González et al., 2009; Jimenez et al., 2011; Sanchez-Varo et al., 2012; Torres et al., 2012). In addition, another pathological feature of this AD model is the formation of abundant axonal dystrophies surrounding the Abeta plaques. Dystrophies accumulated phosphorylated tau, ubiquitinated proteins and autophagic vesicles (Sanchez-Varo et al., 2012; Torres et al., 2012).

Our data demonstrate that lithium administration, starting before the beginning of the neurodegenerative processes, avoids the selective neuronal loss of the SOM/NPY cells in both the hippocampus and entorhinal cortex. This is the first report showing that lithium prevents neuronal loss in AD vulnerable brain regions using *in vivo* studies. Also, our data demonstrate that lithium ameliorates the dystrophic pathology, reducing dramatically the

NPY-positive dystrophic area associated to the Abeta plaques and decreasing the levels of abnormally accumulated LC3-II, AT8 and ubiquitinated proteins. Thus, lithium clearly alleviates most of the neuropathological signs of the PS1/APP model.

As we and others have demonstrated, the PS1/APP mice display GSK-3beta activation and autophagy/lysosomal deficiencies (Lee et al., 2010; Jimenez et al., 2011; Yang et al., 2011; Sanchez-Varo et al., 2012; Torres et al., 2012). Lithium could directly affect the neuronal degeneration by inhibiting the GSK-3beta activity (data not shown; Avila et al., 2010) and/or by activating the autophagy-mediated protein degradation (Sarkar et al., 2005; Heiseke et al., 2009; Parr et al., 2012). These effects would reduce the accumulation of phospho-tau, LC3-II and ubiquitinated proteins and, in consequence, reduce the neurodegenerative process. However, the PS1/APP transgenic model accumulates these proteins in axonal dystrophies surrounding the Abeta plaques. In this sense, we and others have suggested that the formation of axonal dystrophies might be directly implicated in the neuronal degeneration during disease progression (Jin et al., 2011; Sanchez-Varo et al., 2012; Torres et al., 2012; Kandalepas et al., 2013; Xie et al., 2013). This suggestion agrees with recent data from AD patients (Perez-Nievas et al., 2013). Importantly, quantitative data demonstrate that lithium produced a prominent reduction (–60%) of the NPY-positive dystrophic area. This reduction could also be reflected by the decrease in the abnormal accumulation of phospho-tau, LC3-II and ubiquitinated proteins, associated with the dystrophic pathology, surrounding Abeta plaques.

Therefore, besides a putative direct effect either through GSK-3beta activity or autophagy/lysosomal protein degradation, the lithium-mediated amelioration of the neuropathological alterations may likely reflect the dramatic reduction in the formation of dystrophic neurites around the Abeta plaques. This effect could also reflect the lithium-dependent modifications of the Abeta plaque formation.

As we have shown here, lithium produced a prominent change in plaque morphology and quality. In fact, the Abeta plaques were smaller (see also Toledo and Inestrosa, 2009) and more compact in treated than in control PS1/APP mice. In this context, it has been reported that the highly aggregated Abeta possesses a reduced toxicity (Cohen et al., 2009; Condello et al., 2011), and therefore the observed decrease in the dystrophic area per plaque could reflect a reduction in plaque toxicity.

Regarding the plaque toxicity, it has been noted that the formation of axonal dystrophies and the synaptic degeneration seemed to be restricted to the periphery of the Abeta plaques (Koffie et al., 2009; Condello et al., 2011; Xie et al., 2013). This most periphery area (halo) of the plaques might be constituted by partially aggregated Abeta fibrillar oligomers, which could be involved on the AD pathology (Tomic et al., 2009). In this scenario, our data demonstrate that lithium produces a reduction on the fibrillar

oligomeric halo (which is recognized by the conformation specific polyclonal OC antibody) of the Abeta plaques, thus diminishing the plaque toxicity.

The processes contributing in the Abeta aggregation, plaque formation or plaque compaction are actually unknown. It has been suggested that astrocytes could play a prominent role by limiting the plaque growth and the plaque-associated dystrophy formation (Ojha et al., 2011; Kraft et al., 2013). Moreover, activated astrocytes may release, among different factors, Hsps (Renkawek et al., 1994; Taylor et al., 2007), which could induce the Abeta aggregation, reducing its potential toxicity (Ojha et al., 2011; Mannini et al., 2012; Cascella et al., 2013). In agreement with these data, our results strongly suggest the involvement of astrocytes and extracellular Hsps as mediators of the lithium effect on plaque toxicity. In fact, we demonstrate simultaneous higher astrocyte activation with higher incorporation of Hsps in the Abeta plaques and reduced oligomeric plaque halo in lithium treated PS1/APP mice, compared with controls. It is noteworthy the lithium-dependent increase of Hsp70 and Hsp27 in the plaque core. Although further experiments should be done, this particular localization suggests that these Hsps could be implicated in the Abeta nucleation and plaque compaction.

CONCLUSION

Our data demonstrate that the early chronic lithium treatment significantly ameliorates the pathological progression in this PS1/APP AD model. Lithium could reduce neuronal/axonal degeneration by increasing the Abeta compaction and, in consequence, producing smaller Abeta plaques with lower toxic halo. Lithium could influence directly neurons but, as we have shown in this work, this compound has a novel therapeutic effect through astrocytes inducing chaperones release which have the capacity to modulate the Abeta compaction/toxicity. To the best of our knowledge, this is the first time that this therapeutic effect of lithium on Abeta plaque quality has been reported. These data reveal a novel lithium-mediated mechanism capable of altering the course of the disease in an amyloidogenic AD model. These Abeta-modifying mechanism might represent an innovative therapeutic approach to the, so far, continuing negative outcomes of AD clinical trials aimed to clear Abeta plaques once they have already formed, and to the current inability to prevent plaques from forming in the first place.

RESULTADOS SUPLEMENTARIOS: EL TRATAMIENTO CON LITIO PROTEGE DE LA DEGENERACIÓN COLINÉRGICA EN MODELOS DE ALZHEIMER

Con posterioridad a la publicación de estos resultados, se realizó un nuevo tratamiento con cloruro de litio en animales PS1/APP igual al descrito (ver Apdo. 2.1.1) en los experimentos anteriores de este bloque de Resultados, pero en este caso el tratamiento tuvo una duración de 3 meses (desde los 9 a los 12 meses de edad de los animales). Por

tanto, se inició antes de la pérdida de células colinérgicas en los núcleos del telencéfalo basal y de la alteración de sus terminales en el plexo de la capa yuxtapiamidal de CA1, que como se ha descrito en el Bloque 3.2. de Resultados y Discusión, tiene lugar a los 12 meses en los animales PS1/APP, PS1 y TAU. En este experimento se utilizaron cinco grupo de animales: WT sin tratar, PS1 control (sin tratamiento), PS1 litio, PS1/APP control y PS1/APP tratados con litio, y el objetivo fue analizar el efecto terapéutico de este tratamiento en fases avanzadas de la patología, y en concreto, teniendo en cuenta el proceso neurodegenerativo tardío de la población colinérgica, nos centramos en el posible efecto neuroprotector del tratamiento sobre esta población neuronal del telencéfalo basal.

En primer lugar, se procedió a analizar la densidad numérica de células colinérgicas en el NBM (Fig. Suplementaria 1). Se cuantificó sólo este núcleo debido a que disponíamos de hemisferios, ya que el otro hemisferio se utilizó para los estudios bioquímicos y moleculares. Por la disposición del *septum* medial y el núcleo vertical de la banda diagonal de Broca, en la línea media del cerebro, fue difícil conservarlo en todos los hemisferios, por lo que nos limitamos a estudiar la población colinérgica del NBM. La cuantificación estereológica (tamaño del *frame*: 926,39 μm^2 ; 40% de área escaneada) de las células ChAT-positivas del NBM reveló que el tratamiento con litio evitaba la pérdida neuronal observada en los animales PS1/APP a los 12 meses de edad y descrita en el Bloque 3.2 de Resultados y Discusión de esta Tesis. Se observa una reducción significativa en el número de células/ mm^3 en los animales PS1 y PS1/APP control con respecto a los WT ($-26,01 \pm 0,16\%$) y un incremento del $25,37 \pm 10,16\%$ en los animales PS1/APP litio con respecto a los PS1/APP sin tratar ($n=4, 5$ secciones/animal; ADEVA de 1 vía, *post-hoc* de Tukey, $***p < 0,001$, $**p < 0,01$).

Otro de los eventos patológicos relacionados con la población colinérgica descritos en esta Tesis, es la alteración del plexo colinérgico de la capa yuxtapiamidal de CA1 en determinados modelos tg de la EA (PS1/APP, PS1 y TAU). El tratamiento con litio en los animales PS1/APP redujo dicha alteración (Fig. Suplementaria 2). La inmunohistoquímica para ChAT en secciones de hipocampo, contrateñidas con rojo congo para la visualización de las placas fibrilares de Abeta, mostró una mayor inmunorreactividad en el plexo yuxtapiamidal en los animales PS1/APP litio que en aquéllos sin tratar. Esto estaría en concordancia con el efecto protector del litio sobre la población neuronal colinérgica, ya que al proteger a las neuronas de la degeneración, se evitará también la degeneración del plexo axonal en las regiones diana. Por otro lado, se puede observar como el tratamiento con litio provocó una marcada reducción de la patología distrófica colinérgica, ya que se apreció una menor cantidad de neuritas distróficas positivas para ChAT alrededor de las placas de A β en los animales PS1/APP tratados que en aquéllos sin tratar (ver detalles en Fig. Suplementaria 2C).

Tratamiento con litio: 9-12 meses (NBM)

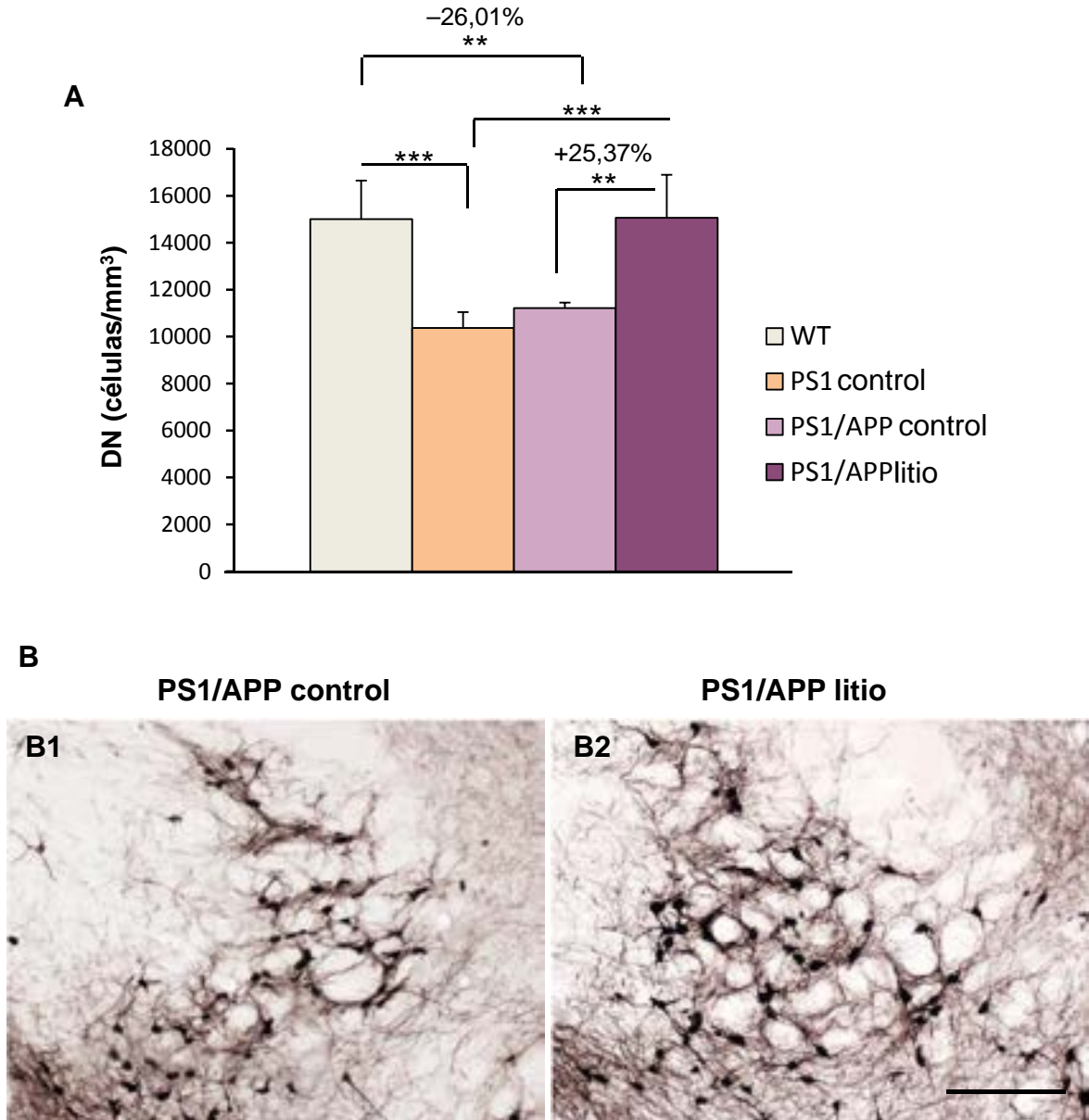


Figura Suplementaria 1. El tratamiento con litio evita la pérdida neuronal colinérgica en el NBM de ratones PS1/APP. A) Densidad numérica (células/mm³) para ChAT en el NBM, a los 12 meses de edad, obtenida mediante estereología. Los grupos PS1 y PS1/APP control mostraron una reducción significativa en el número de células ChAT, mientras que no se detectaron cambios entre los animales WT y los PS1/APP tratados con litio (WT vs PS1/APP control: $-26,01 \pm 0,16\%$; PS1/APP control vs PS1/APP litio: $+25,37 \pm 10,16\%$). B) Secciones del NBM inmunoteñidas con anti-ChAT de animales PS1/APP control (B1) y tratado con litio (B2). Datos representados mediante la media \pm SD y analizados por un ADEVA de 1 vía ($F(3,12)=16,98$, $p=0,0001$), seguido de un *post-hoc* de Tukey, $***p<0,001$, $**p<0,01$. $n=4$ por grupo, 5 secciones por animal. Barras de escala: 200 μ m.

Tratamiento con litio: 9-12 meses (Hipocampo)

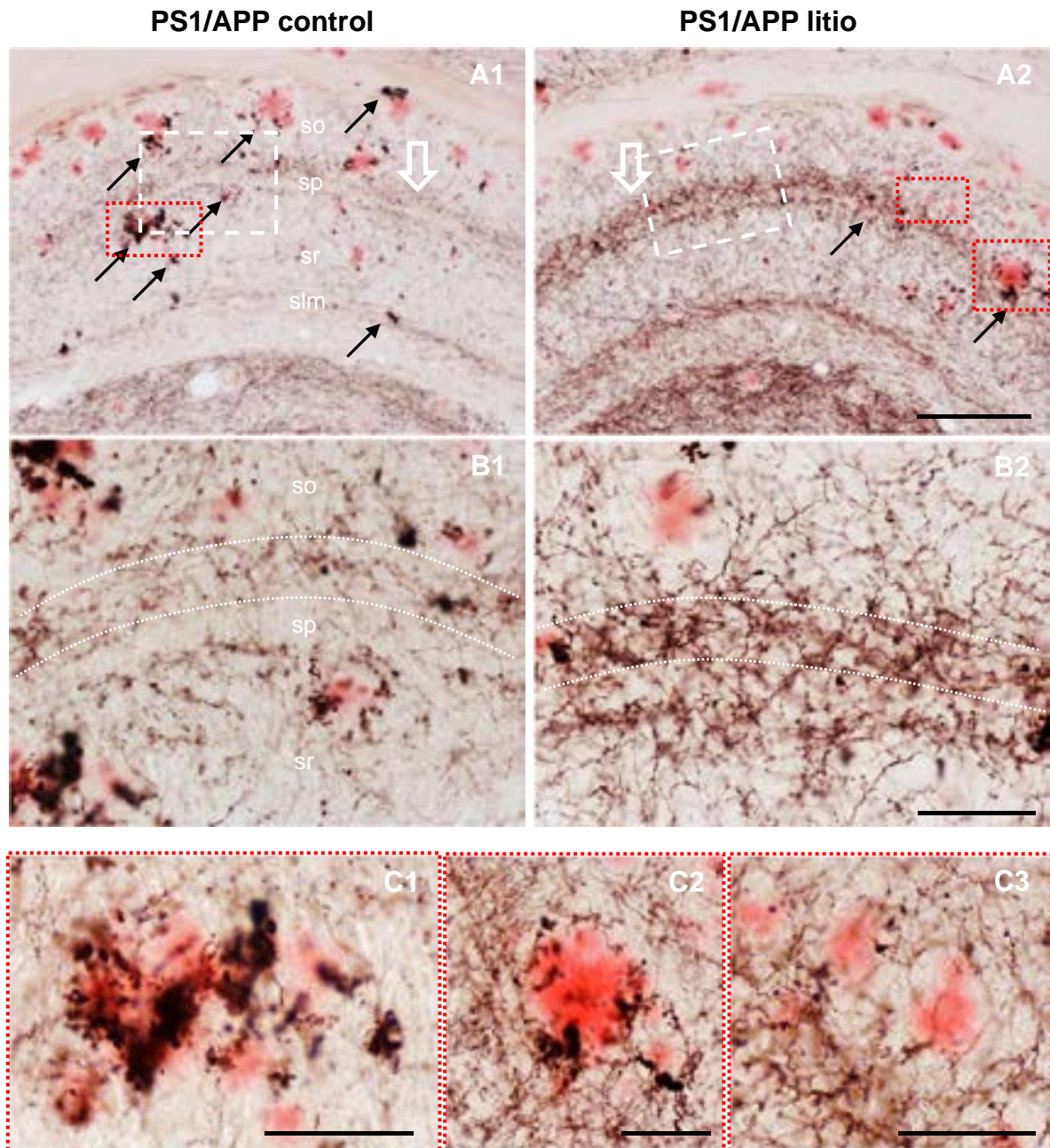


Figura Suplementaria 2. El tratamiento con litio promueve la protección de los plexos axonales colinérgicos y disminuye la formación de distrofias en el hipocampo de animales PS1/APP. Secciones hipocámpales inmunoteñidas para ChAT (con contrateñido de rojo congo para las placas de Abeta) de ratones PS1/APP controles (A1) y tratados con litio (A2). Se observó un aumento de la inervación colinérgica hipocámpal en los animales tratados (A2 y detalle en B2) en comparación con los no tratados (A1 y detalle en B1). Asimismo, se observa una reducción en la patología distrófica colinérgica con el tratamiento (flechas negras en A1 y A2); ver detalles de placas con distrofias en animales no tratados (C1) y tratados (C2 y C3). Barras de escala: A, 200 μm ; B-C, 50 μm . so, *stratum oriens*; sp: *stratum pyramidale*; sr: *stratum radiatum*; slm: *stratum lacunosum-moleculare*.

En relación con la recuperación de los terminales colinérgicos en el hipocampo de los animales PS1/APP tratados con litio, evaluamos los niveles del marcador ChAT mediante *Western-blot* en el hipocampo de animales PS1 control y PS1 litio (Fig. Suplementaria 3). Así, se observó que el tratamiento con litio recupera los niveles hipocampales de ChAT en los animales PS1, no obteniéndose diferencias significativas en dichos niveles entre los animales WT y PS1 tratados con litio, mientras que si se obtuvieron diferencias significativas entre los animales WT y PS1 sin tratar (n=3 animales/grupo; ADEVA de 1 vía, *post-hoc* de Tukey, *p<0,05)

No se determinaron los niveles de ChAT en los animales PS1/APP tratados y sin tratar ya que, como se mostró en el Apdo. 3.2. de Resultados, no se observaron diferencias en los niveles de ChAT entre los animales WT y PS1/APP a los 12 meses de edad, debido, probablemente a la gran cantidad de distrofias colinérgicas presente en el hipocampo de los animales PS1/APP a esta edad, que podría enmascarar la reducción de los niveles de ChAT medidos por WB. Hubiese sido muy interesante analizar por estereología la población de neuronas colinérgicas en los animales PS1 tratados con litio, sin embargo todos los animales se destinaron a estudios moleculares, ya que el sacrificio de los mismos fue con anterioridad al conocimiento de la existencia de pérdida neuronal colinérgica en este modelo transgénico. Se plantea la posibilidad de repetir este experimento para incluir animales PS1 y TAU y comprobar el efecto neuroprotector del litio en los grupos colinérgicos de estos modelos.

Este efecto neuroprotector del litio sobre la población colinérgica podría explicarse por la acción inhibitoria de esta fármaco sobre la enzima GSK-3 β (quinasa de Tau) y por tanto, por la reducción de la fosforilación de Tau (Bhat y col., 2004; Avila y col., 2010; Hernandez y col., 2013). La menor fosforilación de Tau se relaciona con una mejora del citoesqueleto y el transporte axonal, y por tanto con una menor formación de distrofias y una menor degeneración neuronal (Leroy y col., 2012).

Como se ha descrito en el Bloque 3.2. de Resultados, existe una relación entre la hiperfosforilación de Tau y la disfunción colinérgica, que podría explicar el efecto beneficioso del tratamiento con litio sobre la preservación de esta población neuronal. Y es que, aunque las causas de la degeneración colinérgica no se conocen aún, se ha descrito que esta población muestra degeneración neurofibrilar (Sassin y col., 2000), acumulando Tau fosforilado y ovillos neurofibrilares en los estadios tempranos de la enfermedad (Mesulam y col., 2004).

Tratamiento con litio: 9-12 meses (Hipocampo)

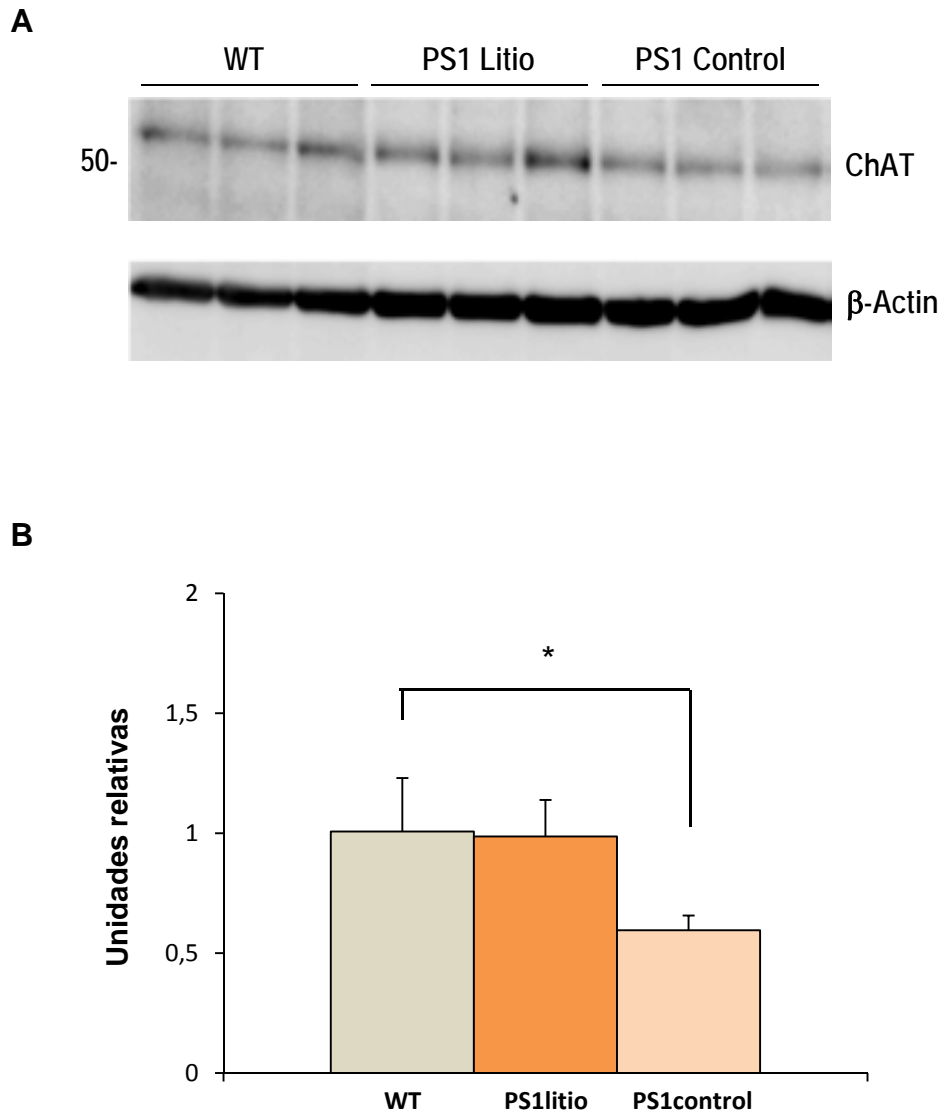


Figura Suplementaria 3. El tratamiento con litio evita la pérdida hipocampal de ChAT en el modelo transgénico PS1. *Western-blot* representativo de los niveles de ChAT en el hipocampo de animales WT, PS1 litio y PS1 control (A) a los 12 meses de edad. La cuantificación (B) reveló una recuperación de los niveles de ChAT en los animales PS1 tratados con litio, mientras que se obtuvieron diferencias significativas entre los animales WT y PS1 control. Los datos se representaron como la media \pm SD y se analizaron por un ADEVA de 1 vía ($F(2,39)=8,90$, $p=0,0007$), seguido de un *post-hoc* de Tukey, $*p<0,05$. $n=3$ animales por grupo.

REFERENCES

- Araujo F, Tan S, Ruano D, Schoemaker H, Benavides J, Vitorica J.** (1996). Molecular and pharmacological characterization of native cortical gamma-aminobutyric acid(A) receptors containing both alpha(1) and alpha(3) subunits. *J Biol Chem.*, 271:27902–27911.
- Avila J, Wandosell F, Hernandez F.** (2010). Role of glycogen synthase kinase-3 in Alzheimer's disease pathogenesis and glycogen synthase kinase-3 inhibitors. *Expert Rev Neurotherapeutics*, 10:703–710.
- Bhat RV, Budd Haerberlein SL, Avila J.** (2004). Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *J Neurochem.*, 89:1313–1317.
- Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, Planche M, Canton T, Jedidi I, Gohin M, Wirths O, Bayer TA, Langui D, Duyckaerts C, Tremp G, Pradier L.** (2003). Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with A[beta] deposits in APP/PS1 transgenic mice. *ExpNeurol.*, 184:247–263.
- Caccamo A, Oddo S, Tran LX, LaFerla FM.** (2007). Lithium reduces Tau Phosphorylation but not Abeta or working memory deficits in a transgenic model with both plaques and tangles. *Am J Pathol.*, 170:1669–1678.
- Cascella R, Conti S, Tatini F, Evangelisti E, Scartabelli T, Casamenti F, Wilson MR, Chiti F, Cecchi C.** (2013). Extracellular chaperones prevent Abeta42-induced toxicity in rat brains. *Biochim Biophys Acta - Molecular Basis of Disease*, 2013:1217–1226.
- Chan-Palay V, Lang W, Allen YS, Haesler U, Polak JM.** (1985). Cortical neurons immunoreactive with antisera against neuropeptide Y are altered in Alzheimer's-type dementia. *J Comp Neurol.*, 238:390–400.
- Cohen E, Paulsson JF, Blinder P, Burstyn-Cohen T, Du D, Estepa G, Adame A, Pham HM, Holzenberger M, Kelly JW, Masliah E, Dillin A.** (2009). Reduced IGF-1 Signaling delays age-associated proteotoxicity in mice. *Cell*, 139:1157–1169.
- Condello C, Schain A, Grutzendler J.** (2011). Multicolor time-stamp reveals the dynamics and toxicity of amyloid deposition. *Sci Rep.*, 1:19.
- Davies P, Katzman R, Terry RD.** (1980). Reduced somatostatin-like immunoreactivity in cerebral cortex from cases of Alzheimer disease and Alzheimer senile dementia. *Nature*, 288:279–280.
- Davis KE, Easton A, Eacott MJ, Gigg J.** (2013). Episodic-like memory for What-Where-Which occasion is selectively impaired in the 3xTgAD mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimer Dis.*, 33:681–698.
- Diniz B, Machado-Vieira R, Forlenza O.** (2013). Lithium and neuroprotection: translational evidence and implications for the treatment of neuropsychiatric disorders. *Neuropsychiatr Dis Treat.*, 9:493–500.
- Feyt C, Kienlen-Campard P, Leroy K, N'Kuli F, Courtoy PJ, Brion JP, Octave JN.** (2005). Lithium Chloride increases the production of Amyloid-beta Peptide independently from its inhibition of Glycogen Synthase Kinase 3. *J Biol Chem.*, 280:33220–33227.
- Filali M, Lalonde R, Theriault P, Julien C, Calon F, Planel E.** (2012). Cognitive and non-cognitive behaviors in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease expressing mutated APP, PS1, and Mapt (3xTg-AD). *Behav Brain Res.*, 234:334–342.
- Forlenza O, Paula V, Machado-Vieira R, Diniz B, Gattaz W.** (2012). Does Lithium Prevent Alzheimer's disease? *Drugs Aging*, 29:335–342.
- Hardy J, Selkoe DJ.** (2002). The Amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297:353–356.
- Heiseke A, Aguib Y, Riemer C, Baier M, Schatzl HM.** (2009). Lithium induces clearance of protease resistant prion protein in prion-infected cells by induction of autophagy. *J Neurochem.*, 109:25–34.
- Hernandez F, Lucas JJ, Avila J.** (2013). GSK3 and Tau: Two Convergence Points in Alzheimer's Disease. *J Alzheimer Dis.*, 33:S141–S144.
- Hoshino T, Murao N, Namba T, Takehara M, Adachi H, Katsuno M, Sobue G, Matsushima T, Suzuki T, Mizushima T.** (2011). Suppression of Alzheimer's disease-related phenotypes by expression of heat shock protein 70 in mice. *J Neurosci.*, 31:5225–5234.
- Jimenez S, Baglietto-Vargas D, Caballero C, Moreno-Gonzalez I, Torres M, Sanchez-Varo R, Ruano D, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J.** (2008). Inflammatory response in the Hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *J Neurosci.*, 28:11650–11661.
- Jimenez S, Torres M, Vizuete M, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Trujillo-Estrada L, Carmona-Cuenca I, Caballero C, Ruano D, Gutierrez A, Vitorica J.** (2011). Age-dependent Accumulation of Soluble Amyloid beta (Abeta) Oligomers reverses the Neuroprotective Effect of Soluble Amyloid Precursor Protein alpha (sAPPalpha) by Modulating Phosphatidylinositol 3-Kinase

- (PI3K)/Akt-GSK-3beta Pathway in Alzheimer mouse model. *J Biol Chem.*, 286:18414–18425.
- Jin M, Shepardson N, Yang T, Chen G, Walsh D, Selkoe DJ.** (2011). Soluble amyloid beta protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108:5819–5824.
- Kandalepas P, Sadleir K, Eimer W, Zhao J, Nicholson D, Vassar R** (2013). Erratum to: The Alzheimer's beta-secretase BACE1 localizes to normal presynaptic terminals and to dystrophic presynaptic terminals surrounding amyloid plaques. *Acta Neuropathol.*, 126:329-352.
- Koffie RM, Meyer-Luehmann M, Hashimoto T, Adams KW, Mielke ML, Garcia-Alloza M, Micheva KD, Smith SJ, Kim ML, Lee VM, Hyman BT, Spire-Jones TL.** (2009). Oligomeric amyloid-beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106:4012–4017.
- Kraft AW, Hu X, Yoon H, Yan P, Xiao Q, Wang Y, Gil SC, Brown J, Wilhelmsson U, Restivo JL, Cirrito JR, Holtzman DM, Kim J, Pekny M, Lee JM.** (2013). Attenuating astrocyte activation accelerates plaque pathogenesis in APP/PS1 mice. *FASEB J.*, 27:187–198.
- Lee JH, Yu WH, Kumar A, Lee S, Mohan PS, Peterhoff CM, Wolfe DM, Martinez-Vicente M, Massey AC, Sovak G, Uchiyama Y, Westaway D, Cuervo AM, Nixon RA.** (2010). Lysosomal Proteolysis and Autophagy require Presenilin 1 and Are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell*, 141:1146–1158.
- Leroy K, Ando K, Laporte V, Dedecker R, Suain V, Authalet M, Héraud C, Pierrot N, Yilmaz Z, Octave JN, Brion JP.** (2012). Lack of Tau proteins rescues neuronal cell death and decreases Amyloidogenic Processing of APP in APP/PS1 Mice. *Am J Pathol.*, 181:1928–1940.
- Mannini B, Cascella R, Zampagni M, Waarde-Verhagen M, Meehan S, Roodveldt C, Campioni S, Boninsegna M, Penco A, Relini A, Kampinga HH, Dobson CM, Wilson MR, Cecchi C, Chiti F.** (2012). Molecular mechanisms used by chaperones to reduce the toxicity of aberrant protein oligomers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109:12479–12484.
- Mesulam M, Shaw P, Mash D, Weintraub S.** (2004). Cholinergic nucleus basalis tauopathy emerges early in the aging-MCI-AD continuum. *Ann Neurol.*, 55(6):815-828.
- Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Del Rio JC, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuete M, Vitorica J, Gutierrez A.** (2009). Extracellular Amyloid- β and Cytotoxic Glial Activation induce significant entorhinal neuron loss in young PS1M146L/APP751SLMice. *J Alzheimers Dis.*, 18:755–776.
- Narayan P, Meehan S, Carver JA, Wilson MR, Dobson CM, Klenerman D.** (2012). Amyloid-beta Oligomers are Sequestered by both Intracellular and Extracellular Chaperones. *Biochemistry*, 51:9270–9276.
- Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, Cuervo AM.** (2005). Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 64:113–122.
- Nunes PV, Forlenza OV, Gattaz WF.** (2007). Lithium and risk for Alzheimer's disease in elderly patients with bipolar disorder. *B J Psychiatry*, 190:359–360.
- Ojha J, Masilamoni G, Dunlap D, Udoff RA, Cashikar AG.** (2011). Sequestration of Toxic Oligomers by HspB1 as a Cytoprotective Mechanism. *Mol Cell Biol.*, 31:3146–3157.
- Parr C, Carzaniga R, Gentleman SM, Van Leuven F, Walter J, Sastre M.** (2012). Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibition Promotes Lysosomal Biogenesis and Autophagic Degradation of the Amyloid- beta Precursor Protein. *Mol Cell Biol.*, 32:4410–4418.
- Perez-Nievas BG, Stein TD, Tai HC, Dols-Icardo O, Scotton TC, Barroeta-Espar I, Fernandez-Carballo L, de Munain EL, Perez J, Marquie M, Serrano-Pozo A, Frosch MP, Lowe V, Parisi JE, Petersen RC, Ikonovic MD, López OL, Klunk W, Hyman BT, Gómez-Isla T.** (2013). Dissecting phenotypic traits linked to human resilience to Alzheimer's pathology. *Brain*, 136:2510–2526.
- Phiel CJ, Wilson CA, Lee VMY, Klein PS** (2003). GSK-3[alpha] regulates production of Alzheimer's disease amyloid-[beta] peptides. *Nature*, 423:435–439.
- Ramos B, Baglietto-Vargas D, Rio JC, Moreno-Gonzalez I, Santa-Maria C, Jimenez S, Caballero C, Lopez-Tellez JF, Khan ZU, Ruano D, Gutierrez A, Vitorica J.** (2006). Early neuropathology of Somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1 x APP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 27:1658–1672.
- Renkawek K, Bosman G, de Jong W.** (1994). Expression of small heat-shock protein hsp 27 in reactive gliosis in Alzheimer disease and other types of dementia. *Acta Neuropathol.*, 87:511–519.
- Sanchez-Varo R, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, De Castro V, Jimenez S, Ruano D, Vizuete M, Davila JC, Garcia-Verdugo JM, Jimenez AJ, Vitorica J, Gutierrez A.** (2012). Abnormal accumulation of

- autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer's mice hippocampus. *Acta Neuropathol.*, 123:53–70.
- Sarkar S, Floto RA, Berger Z, Imarisio S, Cordenier A, Pasco M, Cook LJ, Rubinsztein DC.** (2005). Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J Cell Biol.*, 170:1101–1111.
- Sarkar S, Rubinsztein DC.** (2006). Inositol and IP3 Levels Regulate Autophagy: Biology and Therapeutic Speculations. *Autophagy*, 2:132–134.
- Sassin I, Schultz C, Thal DR, Rüb U, Arai K, Braak E, Braak H.** (2000). Evolution of Alzheimer's disease-related cytoskeletal changes in the basal nucleus of Meynert. *Acta Neuropathol.*, 100(3):259–269.
- Su Y, Ryder J, Li B, Wu X, Solenberg P, Brune K, Paul S, Zhou Y, Liu F, Ni B.** (2004). Lithium, a common drug for bipolar disorder treatment, regulates amyloid-beta precursor protein processing. *Biochemistry*, 43:6899–6908.
- Sudduth TL, Wilson JG, Everhart A, Colton CA, Wilcock DM.** (2012). Lithium treatment of APPSwDI/NOS2 (-/-) Mice Leads to Reduced Hyperphosphorylated Tau. Increased amyloid deposition and altered inflammatory phenotype. *PLoS ONE*, 7:e31993.
- Taylor AR, Robinson MB, Gifondorwa DJ, Tytell M, Milligan CE.** (2007). Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: Role of signaling kinases. *Devel Neurobiol.*, 67:1815–1829.
- Toledo EM, Inestrosa NC.** (2009). Activation of Wnt signaling by lithium and rosiglitazone reduced spatial memory impairment and neurodegeneration in brains of an APPswe/PSEN1DeltaE9 mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*, 15:272–285.
- Tomic JL, Pensalfini A, Head E, Glabe CG.** (2009). Soluble fibrillar oligomer levels are elevated in Alzheimer's disease brain and correlate with cognitive dysfunction. *Neurobiol Disease*, 35:352–358.
- Torres M, Jimenez S, Sanchez-Varo R, Navarro V, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Carmona I, Davila JC, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J.** (2012). Defective lysosomal proteolysis and axonal transport are early pathogenic events that worsen with age leading to increased APP metabolism and synaptic Abeta in transgenic APP/PS1 hippocampus. *Mol Neurodegener.*, 7:59.
- Wyss-Coray T, Rogers J.** (2012). Inflammation in Alzheimer Disease's. A Brief Review of the Basic Science and Clinical Literature. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, 2:a006346.
- Xie H, Hou S, Jiang J, Sekutowicz M, Kelly J, Bacskai BJ.** (2013). Rapid cell death is preceded by amyloid plaque-mediated oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110:7904–7909.
- Yang DS, Stavrides P, Mohan PS, Kaushik S, Kumar A, Ohno M, Schmidt SD, Wesson D, Bandyopadhyay U, Jiang Y, Pawlik M, Peterhoff CM, Yang AJ, Wilson DA, St George-Hyslop P, Westaway D, Mathews PM, Levy E, Cuervo AM, Nixon RA.** (2011). Reversal of autophagy dysfunction in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease ameliorates amyloid pathologies and memory deficits. *Brain*, 134:258–277.
- Yin KJ, Cirrito JR, Yan P, Hu X, Xiao Q, Pan X, Bateman R, Song H, Hsu FF, Turk J, Xu J, Hsu CY, Mills JC, Holtzman DM, Lee JM.** (2006). Matrix Metalloproteinases expressed by astrocytes mediate extracellular Amyloid-beta peptide catabolism. *J Neurosci.*, 26:10939–10948.
- Young AH.** (2011). More good news about the magic ion: lithium may prevent dementia. *B J Psychiatry*, 198:336–337.
- Yu WH, Cuervo AM, Kumar A, Peterhoff CM, Schmidt SD, Lee JH, Mohan PS, Mercken M, Farmery MR, Tjernberg LO, Jiang Y, Duff K, Uchiyama Y, Näslund J, Mathews PM, Cataldo AM, Nixon RA.** (2005). Macroautophagy—a novel beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol.*, 171:87–98.

3.4.

Evaluación preclínica en un modelo transgénico de Alzheimer del potencial terapéutico de una nueva estatina

INTRODUCCIÓN

La asociación entre la enfermedad de Alzheimer y los niveles de colesterol en sangre ha crecido en la última década (ver revisiones Maulik y col., 2013; Barone y col., 2014), proponiéndose la llamada hipótesis del colesterol de la EA. La primera evidencia de esta relación fue hallada por Sparks y col. (1990) al observar que los pacientes con enfermedad coronaria avanzada tenían placas seniles similares a las observadas en los pacientes de la EA. Posteriormente, proporcionaron la primera prueba de que el colesterol puede influir en la producción de A β , mostrando que una dieta rica en colesterol provocaba la formación de placas en el cerebro de conejos (Sparks y col., 1994).

A partir de ahí, se han desarrollado estudios epidemiológicos que establecen que la hipercolesterolemia en la edad adulta se correlaciona con un incremento en el riesgo de padecer EA (Ricciarelli y col., 2012), proponiéndose el colesterol como un factor de riesgo de la enfermedad (Pappolla y col., 2003). Por otro lado, los estudios epidemiológicos han mostrado una disminución en la prevalencia de la EA en pacientes tratados con estatinas, fármacos utilizados para reducir los niveles de colesterol (Wood y col., 2014). En este sentido, el estudio Rotterdam (Haag y col., 2009), mostró que las estatinas se correlacionan con una reducción de casi el 50% en el riesgo de padecer Alzheimer. Resultados positivos también fueron obtenidos en un ensayo clínico en fase II con atorvastatina (Sparks y col.,

2005; 2006). Por otro lado, en varios estudios, se han hallado niveles elevados de colesterol en pacientes de EA (Lehtonen y Luutonen, 1986; ver revisión Silva y col., 2013). Además, el polimorfismo en la Apolipoproteína E (ApoE) se considera un factor de riesgo del Alzheimer (Czech y col., 1994; ver revisiones Maulik y col., 2013; Silva y col., 2013). Por último, estudios experimentales, en modelos animales y cultivos celulares, han mostrado que aumentando/reduciendo los niveles de colesterol, se alteran los niveles de A β en el cerebro (Refole y col., 2000; Fassbender y col., 2001; Burns y Rebeck, 2010; Posse de Chaves y col., 2012; ver revisiones Maulik y col., 2013; Wood y col., 2014).

Por todo esto, el tratamiento con estatinas se ha propuesto como una terapia efectiva para parar o retrasar el proceso neurodegenerativo que tiene lugar en la EA. No obstante, se han producido muchas discrepancias entre los resultados obtenidos en estudios preclínicos, epidemiológicos y ensayos clínicos, por lo que la eficacia de este tratamiento sigue bajo debate (ver revisiones Rockwood, 2006; Pac-Soo y col., 2011; Shepardson y col., 2011; Sparks y col., 2011; Silva y col., 2013; Barone y col., 2014; Wood y col., 2014).

Las estatinas son una familia de fármacos con funciones pleiotrópicas (ver revisión McGuinness y Passmore, 2010), prescritas para el tratamiento de la hipercolesterolemia y dislipidemias. A esta clase pertenecen ocho compuestos comerciales: mevastatina, lovastatina, pravastatina, simvastatina, atorvastatina, fluvastatina, rosuvastatina y pitavastatina. Su mecanismo de acción es la inhibición de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa, bloqueando la conversión de HMG-CoA en mevalonato (Fig. 3.4.1), la primera etapa en la síntesis del colesterol (ver revisiones Silva y col., 2013; Barone y col., 2014).

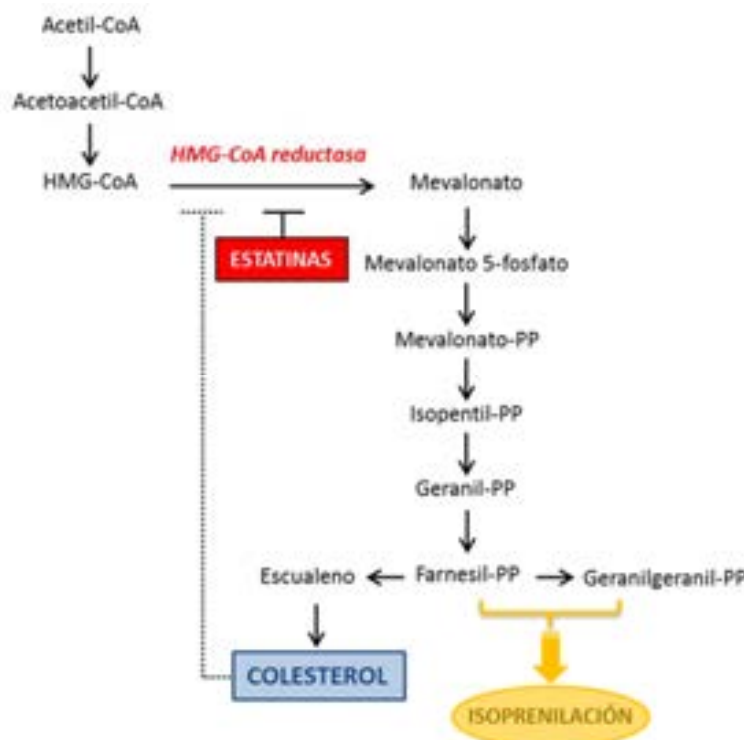


Figura 3.4.1. Representación esquemática de las principales etapas implicadas en la biosíntesis del colesterol. La enzima limitante de la ruta es la HMG-CoA reductasa (en rojo), que cataliza la síntesis de mevalonato a partir de HMG-CoA. Esta enzima está controlada por los niveles de colesterol, de manera que niveles elevados la inhiben (línea de puntos). Las estatinas son inhibidores de la HMG-CoA reductasa y, por tanto, actúan disminuyendo los niveles de intermediarios isoprenoides y de colesterol (Modificado de Pac-Soo y col., 2011; Maulik y col., 2013).

En este trabajo hemos evaluado el potencial terapéutico neuroprotector de una nueva estatina no comercial (NST0037), diseñada y patentada por la empresa Neuron Bio, en un modelo animal transgénico PS1/APP de la enfermedad de Alzheimer. Las estatinas comerciales han sido desarrolladas para disminuir los niveles de colesterol en plasma, pero solo algunas tienen una aceptable permeabilidad a la barrera hematoencefálica (Burgos y col., 2012). Por ello, y en colaboración con la empresa Neuron Bio, evaluamos la posible mayor eficacia de su nuevo compuesto (ver fórmula en el apartado 2.1.2 de Material y Métodos, pág. 67). Neuron nos suministró los animales tratados con una dieta crónica enriquecida con el compuesto NST0037 (el grupo A, un total de 5 animales, fue tratado con una dosis mayor, y el grupo B formado por 11 animales con una dosis menor; ambas dosis terapéuticas), así como otro grupo de animales transgénicos alimentados con una dieta normal que se utilizó como grupo control (grupo C; 8 animales). Hay que puntualizar que el estudio histológico y molecular se realizó a ciegas, sin conocer cuáles eran los grupos tratados y control hasta la finalización del estudio. El tratamiento se realizó desde los 6 hasta los 12 meses de edad por vía oral (ver Apdo. 2.1.2. de Material y Métodos). Los animales empleados en el estudio son doble transgénicos PS1d9/APP (Jankowsky y col., 2004) que sobreexpresan la forma humana mutada de la proteína precursora amiloide APP (APP695 con la doble mutación *Swedish* K594M/N596L) y el gen *PS1* con una delección del exón 9 (ver Apdo. 2.1. de Material y Métodos). Este modelo muestra placas desde los 4 meses, acompañadas de activación glial, déficits de aprendizaje a los 12 meses (Xiong y col., 2011) y anormalidades neuríticas desde los 7-8 meses (García-Alloza y col., 2009). El objetivo ha sido evaluar el efecto de este nuevo compuesto sobre la patología amiloide y el proceso neurodegenerativo en este modelo animal de Alzheimer.

RESULTADOS

3.4.1. Reducción de la carga amiloide por el tratamiento

Una de las marcas histopatológicas de la enfermedad de Alzheimer, posiblemente la más estudiada, es la aparición de depósitos extracelulares formados por la proteína β -amiloide (ver revisión Perl, 2010; Claeysen y col., 2012; Apdo. 1.1.2 de Introducción). Se sabe que el $A\beta$ es neurotóxico (al menos las formas oligoméricas; Haass y Selkoe, 2007; Martins y col., 2008; ver Apdo. 1.1.3.4.2 de Introducción). El modelo PS1d9/APP se caracteriza por la formación de depósitos amiloides desde edades tempranas. Las primeras placas aparecen a los 4 meses de edad en el hipocampo y corteza, afectando, posteriormente a otras regiones cerebrales (Jankowsky y col., 2004; Liu y col., 2004; Savonenko y col., 2005; García-Alloza y col., 2006). Por ello, en primer lugar, se procedió a investigar el efecto del tratamiento *in vivo* de un nuevo compuesto (estatina) sobre la producción de $A\beta$ en el cerebro de este modelo transgénico. Este tratamiento

redujo significativamente la carga total de A β en el hipocampo medida mediante *Western-blot* (WB), utilizando el anticuerpo monoclonal 6E10 (Fig. 3.4.2A; con respecto al grupo control C: $-84,99 \pm 10,46\%$ en el grupo A y $-66,46 \pm 25,54\%$ en el grupo B; $n=5-11$ animales/grupo; ADEVA de 1 vía, *post-hoc* de Tukey, $*p < 0,05$) en ambos grupos tratados, siendo más patente en el grupo A (el de mayor dosis de tratamiento). El anticuerpo monoclonal 6E10 reconoce los primeros 17 aminoácidos del péptido amiloide humano y, por tanto, reconoce el A β total, independientemente de su agregación en forma de monómeros, oligómeros o fibrilar y, además, se une a la forma sin procesar del APP y a las ya procesadas. Seguidamente, se comprobó, mediante ELISA (Fig. 3.4.2B), que la reducción en los niveles de A β se produjo tanto en las formas solubles de A β 42 (Fig. 3.4.2B1; $-56,87 \pm 36,89\%$ en el grupo A y $-53,92 \pm 13,32\%$ en el grupo B) como de A β 40 (Fig. 3.4.2B2; $-60,40 \pm 14,64\%$ en el grupo B; $n=5-11$ animales/grupo; ADEVA de 1 vía, *post-hoc* de Tukey, $*p < 0,05$).

Una vez conocíamos el efecto beneficioso del tratamiento reduciendo los niveles de A β , se procedió a analizar la carga amiloide fibrilar mediante análisis de imagen en secciones teñidas con Tioflavina S (Fig. 3.4.3). Esta carga amiloide se expresó en tanto por ciento del área de la región a estudiar (CA1 en Fig. 3.4.3B; giro dentado en Fig. 3.4.3C) ocupada por las placas amiloides. La Tioflavina S es una fluoresceína que se une exclusivamente a moléculas con estructura de hoja β -plegada y, por tanto, a las formas fibrilares del β -amiloide. La cuantificación de la carga amiloide (*plaque loading*) mostró una reducción tanto en CA1 (con respecto al grupo control C: $-75,43 \pm 11,06\%$ en el grupo A y $-60,26 \pm 18,73\%$ en el grupo B) como en el giro dentado (con respecto al grupo control C: $-63,86 \pm 24,19\%$ en el grupo A y $-52,93 \pm 24,28\%$ en el grupo B) que era más patente en el grupo con una mayor dosis del tratamiento (grupo A; $n=5-11$, 5 secciones/animal; ADEVA de 1 vía, *post-hoc* de Tukey, $***p < 0,001$).

La disminución de la carga amiloide con el tratamiento puede estar relacionado con una reducción en el número de placas, del tamaño de las mismas o de ambos. Para dilucidar este punto, hemos analizado, por un lado la densidad numérica de placas teñidas con Tioflavina S en la región CA1 del hipocampo (número de placas/ mm^3 ; Fig. 3.4.3D). Por otro lado, hemos clasificado las placas en cuatro rangos de tamaños (placas de $< 200 \mu\text{m}^2$, entre $200-500 \mu\text{m}^2$, de 500 a $1000 \mu\text{m}^2$ y placas con un tamaño superior a las $1000 \mu\text{m}^2$) y hemos analizado el número de placas de cada rango de tamaño por mm^2 , así como el porcentaje de placas de cada rango presente en cada uno de los tres grupos de estudio (Fig. 3.4.4).

La cuantificación estereológica (tamaño del *frame*: $926,39 \mu\text{m}^2$; 20% del área escaneada) reveló una notable disminución en la densidad numérica de placas (Fig. 3.4.3D) en los grupos tratados (con respecto al grupo control C: $-68,46 \pm 10,17\%$ en el grupo A y

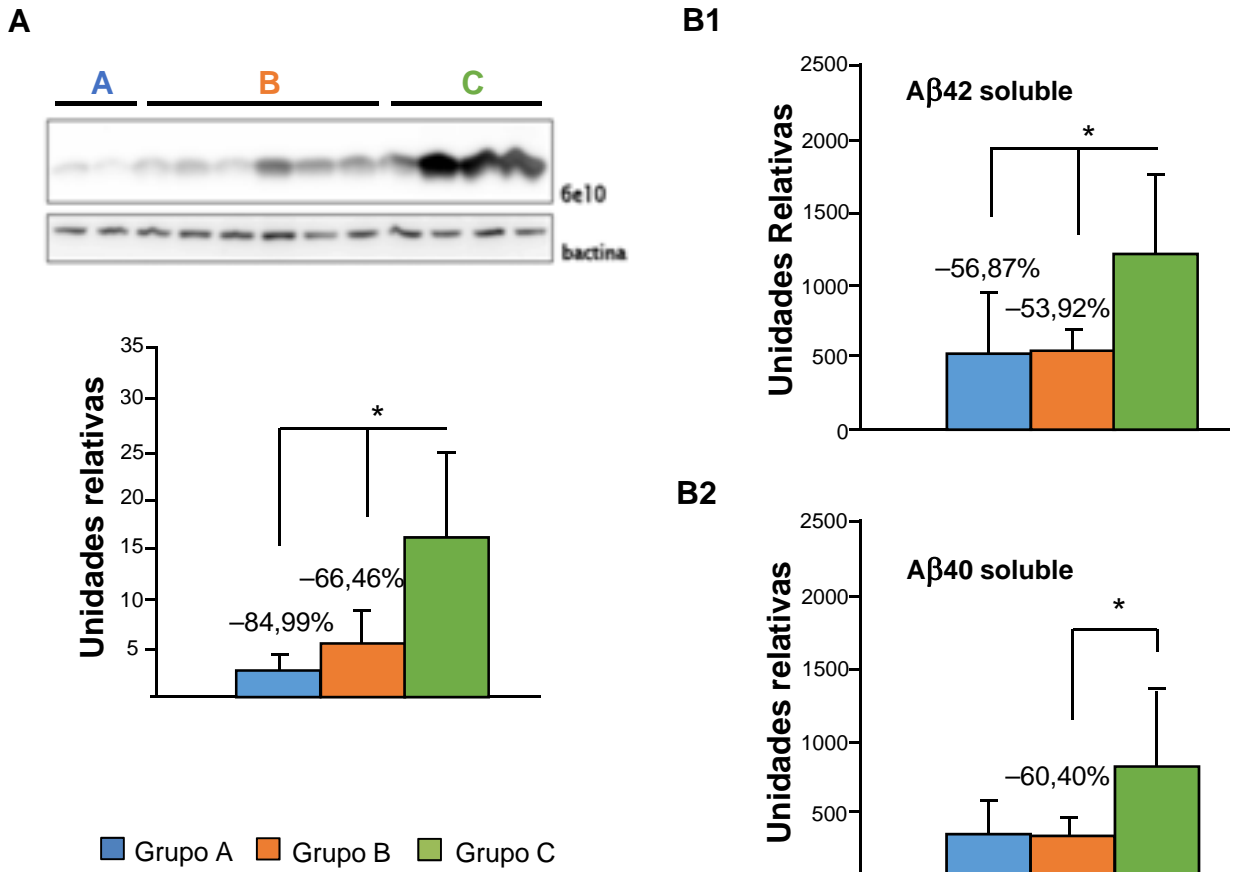


Figura 3.4.2. El tratamiento con el compuesto NST0037 reduce significativamente la carga amiloide. A) *Western-blot* (WB) para 6E10 que muestra una reducción en la carga total de A β en los grupos A y B en relación con el grupo sin tratamiento (grupo C). B) Mediante ELISA, detectamos una reducción en los niveles de A β 42 soluble (B1) así como de A β 40 soluble (B2) en los animales que pertenecían a grupos con tratamiento. Datos representados por media \pm SD, analizados mediante ADEVA de 1 vía (6E10 $F(2,21)=11,19$, $p=0,0005$; A β 42 $F(2,21)=7,33$, $p=0,0038$; A β 40 $F(2,21)=6,07$, $p=0,016$), seguido de un *post-hoc* de Tukey, * $p<0,05$. $n=5-11$ por grupo.

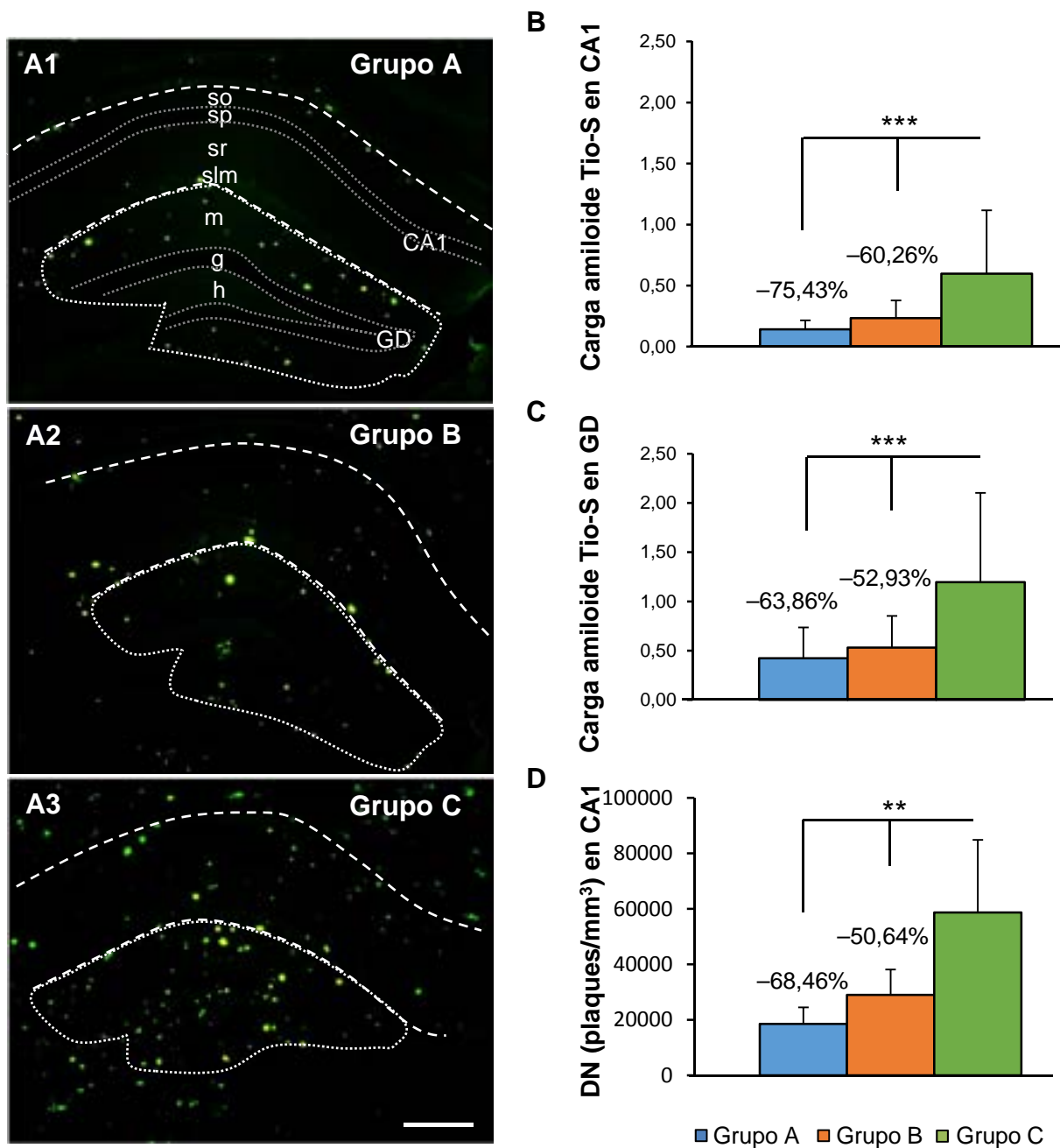


Figure 3.4.3. El compuesto NST0037 reduce significativamente la carga amiloide fibrilar del hipocampo. A) Imágenes representativas de la tinción de Abeta fibrilar con Tioflavina S en el hipocampo de animales tratados (A1-A2) y controles (A3). El análisis cuantitativo de la carga amiloide fibrilar en CA1 (B) y el giro dentado (C) mostró una disminución en dicha carga en los animales tratados (grupos A y B) comparados con los controles de la misma edad (carga amiloide en CA1 comparada con el grupo C: $-75,43 \pm 11,06\%$ para el grupo A; $-60,26 \pm 18,73\%$ para B; carga amiloide en el GD en relación al grupo C: $-63,86 \pm 24,19\%$ para el grupo A; $-52,93 \pm 24,28\%$ para el B). D) La cuantificación estereológica de la densidad de placas (placas/mm³) mostró una reducción significativa en los grupos tratados (en relación al grupo C: $-68,46 \pm 10,17\%$ para el grupo A; $-50,64 \pm 15,60\%$ para B). Los datos representan la media \pm SD y fueron analizados mediante un ADEVA de 1 vía (CA1 $F(2,110)=20,07$, $p < 0,0001$; GD $F(2,108)=1,22$, $p < 0,0001$; DN $F(2,21)=11,23$, $p=0,0005$), seguido de un *post-hoc* Tukey, $***p < 0,001$, $**p < 0,01$. $n=5-11$ por grupo, 5 secciones por animal. Barras de escala: A1-A3, 200 μ m. GD: giro dentado; so: *stratum oriens*; sp: *stratum pyramidale*; sr: *stratum radiatum*; slm: *stratum lacunosum-moleculare*; m: capa molecular; g: capa granular; h: hilio.

-50,64±15,60% en el grupo B; n=5-11, 5 secciones/animal; ADEVA de 1 vía, *post-hoc* de Tukey, **p<0,01). Por tanto, el tratamiento con este nuevo compuesto provoca una disminución en el número de placas hipocampales de este modelo animal.

La siguiente cuestión a solventar fue si el tratamiento afectaba por igual a todas las categorías de tamaño de placas. Para ello, analizamos los grupos tratados (A y B) respecto al control (C) con la tinción de Tioflavina S (Fig. 3.4.4A). El análisis estereológico (tamaño del *frame*: 7100,7 μm^2 ; 20% del área escaneada) reveló que en el hipocampo (región CA1) del grupo C había un mayor número de placas fibrilares (Tioflavina S positivas) por mm^2 para todos los rangos de tamaño analizados (Fig. 3.4.4B; n=5-11, 5 secciones/animal; ADEVA de 1 vía, *post-hoc* de Tukey, ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05). La representación de estos datos, en porcentaje, mediante diagrama de barras apilado (Fig. 3.4.4C), mostró que no existen diferencias significativas en el porcentaje de placas, para todos los rangos de tamaño analizados, entre los tres grupos de estudio. Por tanto, la reducción en la carga amiloide observada con el tratamiento es debido a una disminución en el número de placas existentes y no a una variación en el tamaño de éstas.

En la EA, las mutaciones que afectan a los genes de *PS1* y *PS2* producen una variación en la especificidad del corte de la γ -secretasa en el dominio transmembrana del APP, dando lugar a un aumento en la proporción de A β 42/A β 40, incrementándose la producción de A β 42, más hidrofóbico (finaliza con dos residuos hidrofóbicos adicionales con respecto al A β 40, Ile y Ala) y, por lo tanto, con mayor tendencia a agregarse y formar fibrillas. La tinción inmunohistoquímica con un anticuerpo policlonal específico para esta forma de β -amiloide (Fig. 3.4.5) mostró, al igual que para los depósitos fibrilares teñidos con Tioflavina S, una reducción del inmunomarcaje en el hipocampo de los grupos A y B con respecto al grupo no tratado (grupo C). Asimismo se pudo observar un cambio cualitativo en la densidad de las placas (intensidad de la inmunotinción), siendo éstas más compactas en los grupos tratados que en el grupo control (Fig. 3.4.5D-F), lo que podría indicar una menor toxicidad de las placas con el tratamiento, como se ha descrito en el tratamiento con litio (ver Bloque 3.3 de Resultados y Discusión).

El análisis cualitativo (Fig. 3.4.6A-B) y cuantitativo (Fig.3.4.6C-D) de la carga amiloide para A β 42 mostró una reducción significativa en la misma (n=5-11, 5 secciones/animal; ADEVA de 1 vía, *post-hoc* de Tukey, ***p<0,001) con el tratamiento, tanto en CA1 (con respecto al grupo C: -35,86±16,83% en el grupo A y -50,13±18,21% en el grupo B) como en el giro dentado (con respecto al grupo C: -18,71±9,35% en el grupo A y -32,26±20,34% en el B).

Como ya hemos comentado, el *subiculum* (ver Capítulo 3.1 de Resultados y Discusión) es una región del hipocampo que se encuentra muy afectada por la patología amiloide en modelos de la EA, al igual que en los pacientes, por lo que se procedió a analizar el efecto del tratamiento sobre la carga amiloide en esta región (Fig. 3.4.7). Los

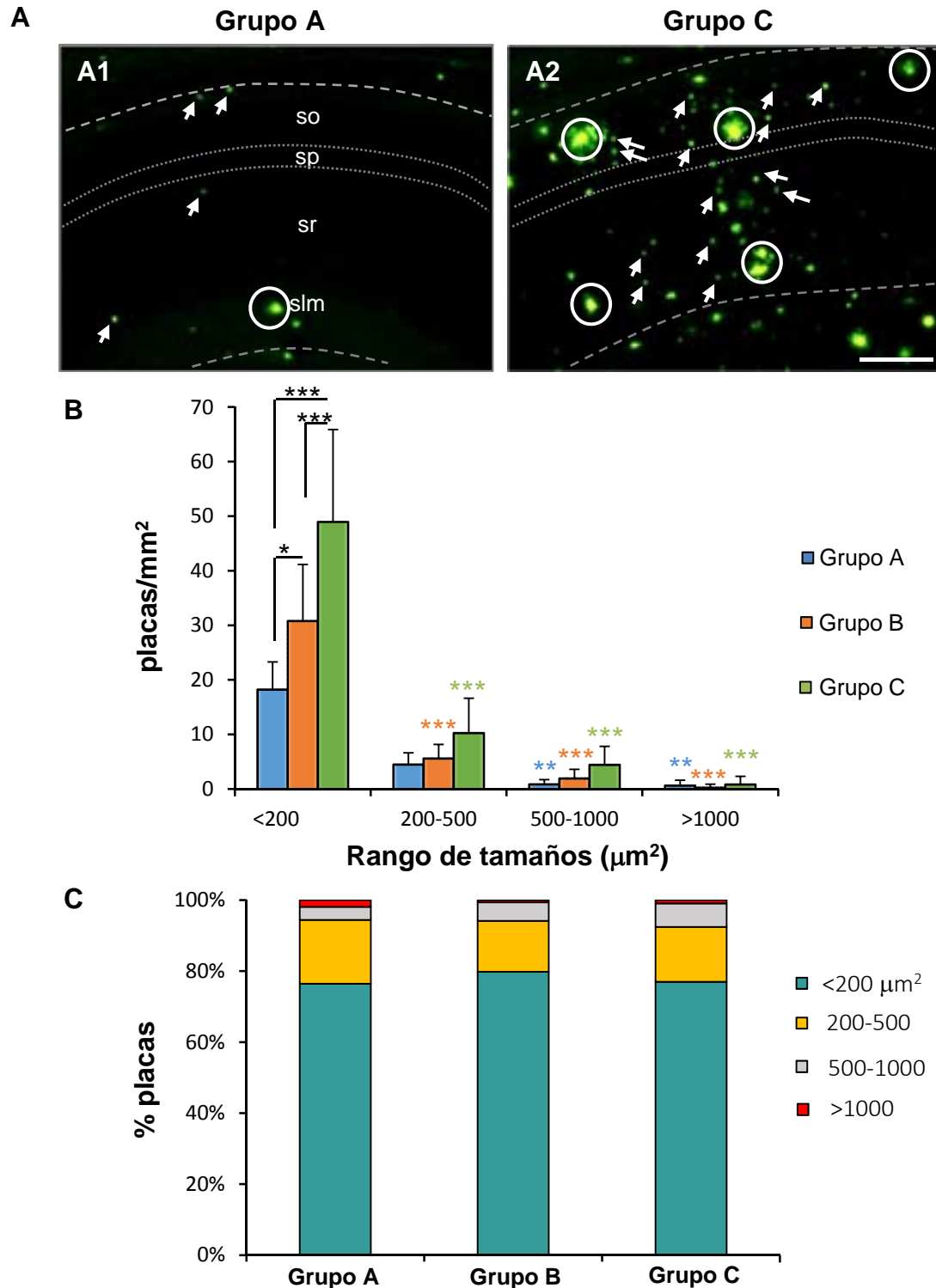
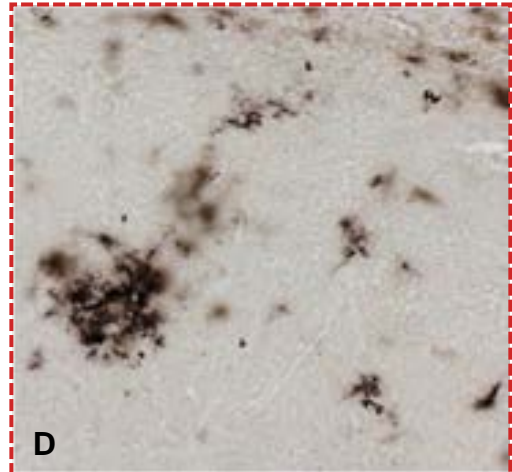
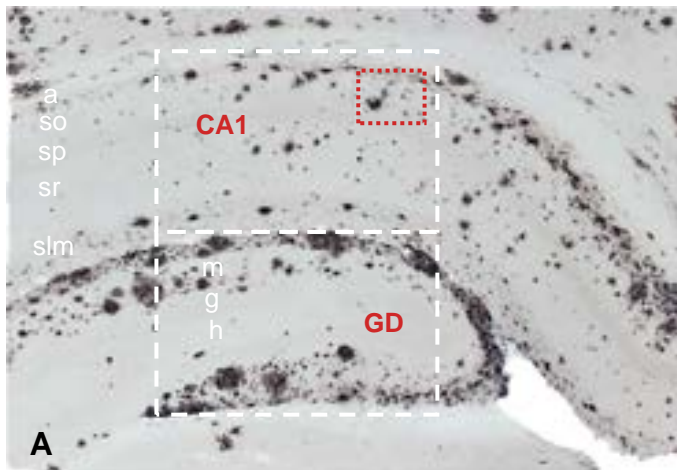
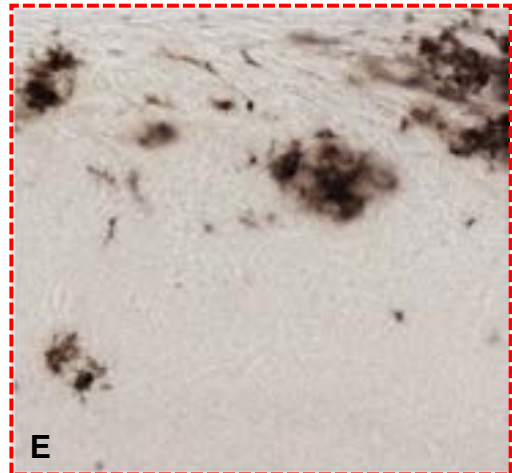
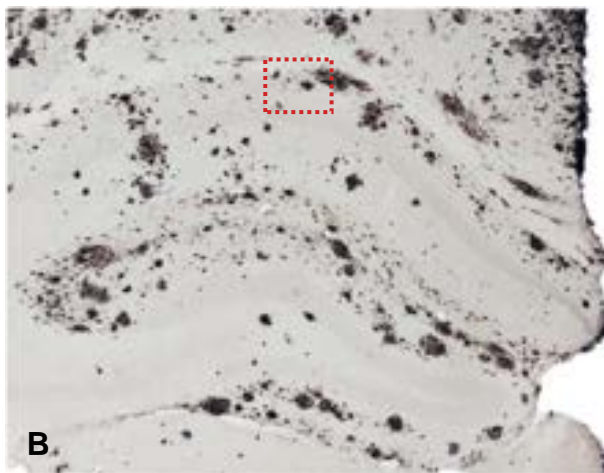


Figura 3.4.4. Estudio del efecto de NST0037 sobre la cantidad y tamaño de las placas fibrilares en CA1. A) La tinción con Tioflavina S en la región CA1 del hipocampo muestra un descenso en la cantidad de placas (placas/mm²) en el grupo A (A1) comparado con el grupo control (A2). La cantidad de placas (B) es más alta en el grupo control que en los grupos tratados para todos los rangos de tamaño analizados (<200 μm^2 , 200-500 μm^2 , 500-1000 μm^2 y >1000 μm^2). No se observaron cambios en los porcentajes de las placas por tamaño entre los diferentes grupos (C). Los datos representan la media \pm SD y fueron analizados por un ADEVA de 1 vía (placas/mm² $F(11,84)=43,61$, $p<0,0001$; %placas $F(11,84)=287,1$, $p<0,0001$), seguido de un *post-hoc* Tukey, *** $p<0,001$, ** $p<0,01$, * $p<0,05$. $n=5-11$ por grupo, 5 secciones por animal. Barras de escala: A1-A2, 200 μm . so: *stratum oriens*; sp: *stratum pyramidale*; sr: *stratum radiatum*; slm: *stratum lacunosum-moleculare*.

Grupo A



Grupo B



Grupo C

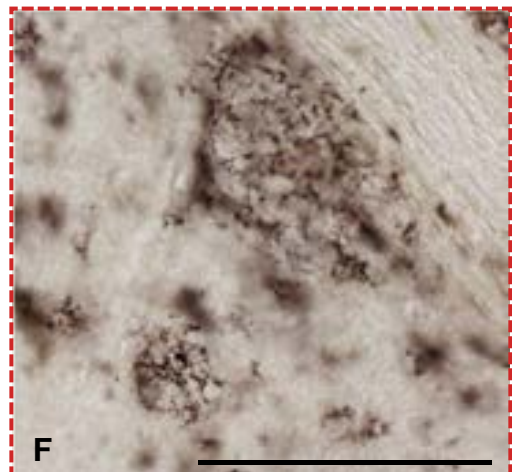
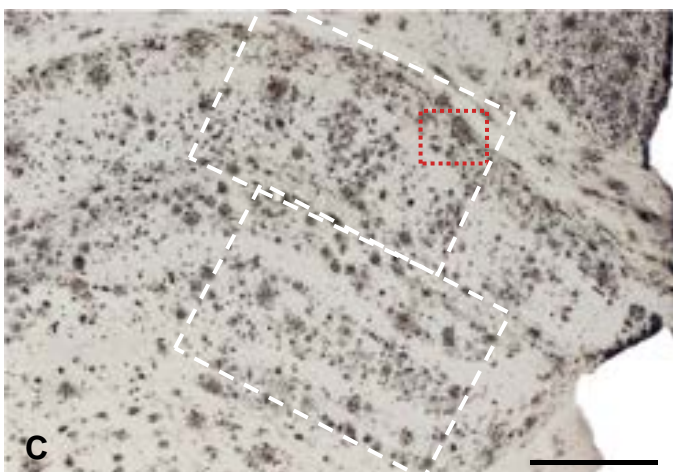


Figura 3.4.5. El tratamiento con el compuesto NST0037 reduce notablemente la carga de Aβ42. El tratamiento provocó un patente descenso en la acumulación extracelular de Aβ42 en el hipocampo de los animales tratados (A y B) en comparación con el grupo control (C). Imágenes a mayores aumentos de CA1 y GD (rectángulo blanco) se muestran en la Fig. 3.4.6. Como se puede ver en las imágenes de detalle (D, E y F) las placas de los animales tratados (D y E) eran más compactas (más densas) que en el grupo control (F). Barras de escala: A-C, 500 μm; D-F, 50 μm. GD: giro dentado; a: *alveus*; so: *stratum oriens*; sp: *stratum pyramidale*; sr: *stratum radiatum*; slm: *stratum lacunosum-moleculare*; m: capa molecular; g: capa granular; h: hilio.

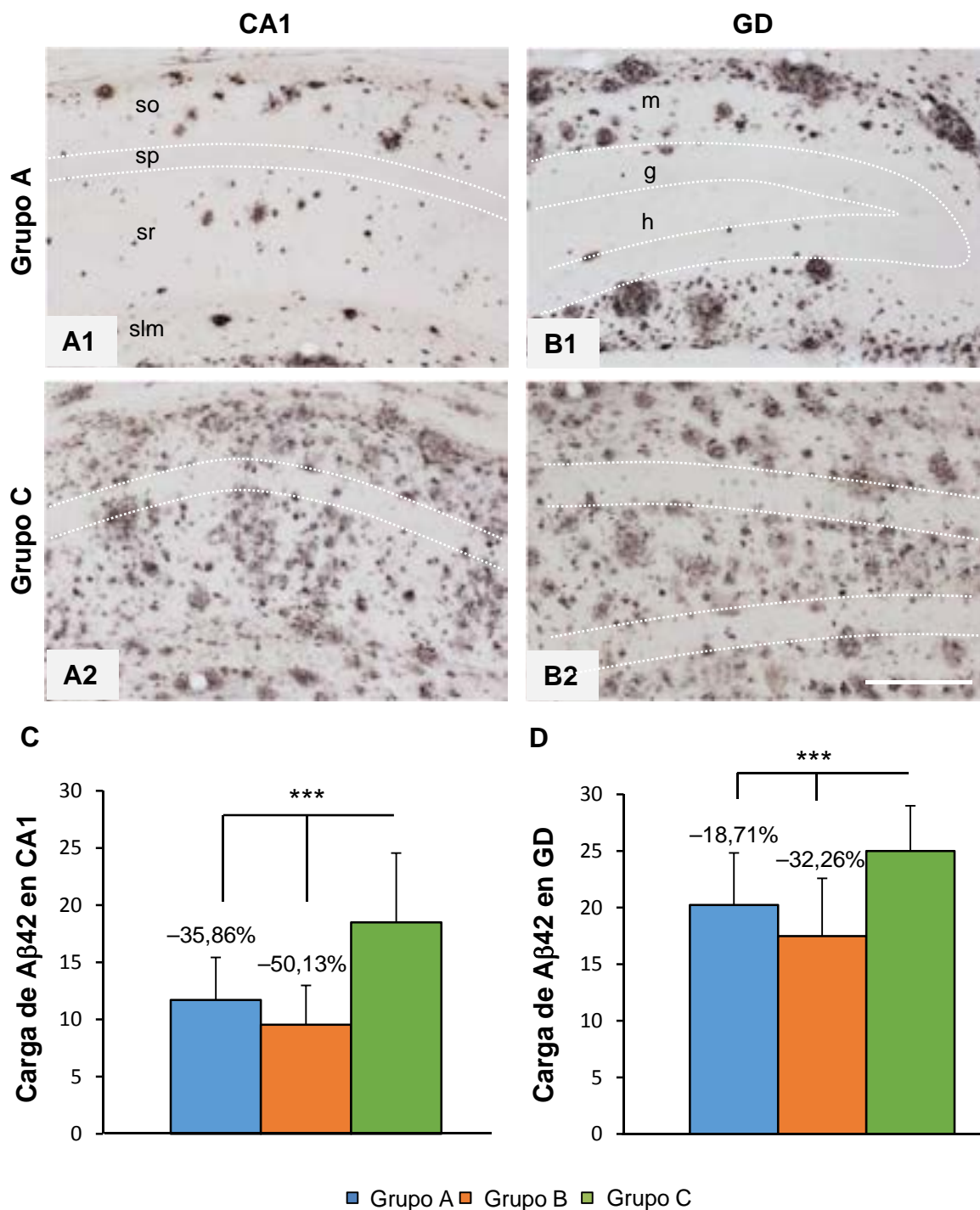


Figura 3.4.6. El tratamiento con el compuesto NST0037 reduce la carga de Aβ42 en el hipocampo del modelo PS1/APP. Tanto en la región CA1 (A, C) como en el GD (B, D) se observa una marcada reducción en la carga de Aβ42 en el grupo A (A1-B1) comparado con el grupo control (A2-B2) (carga en CA1 en relación al grupo C: $-35,86 \pm 16,83\%$ en el grupo A; $-50,13 \pm 18,21\%$ en el B; carga en el GD en relación al grupo C: $-18,71 \pm 9,35\%$ en A; $-32,26 \pm 20,34\%$ en B). Los datos representan la media \pm SD y fueron analizados mediante un ADEVA de 1 vía (CA1 $F(2,100)=39,42$, $p < 0,0001$; GD $F(2,101)=25,78$, $p < 0,0001$), seguido de un *post-hoc* de Tukey, $***p < 0,001$. $n=5-11$ por grupo, 5 secciones por animal. Barras de escala: A-B, 200 μ m. GD: giro dentado; so: *stratum oriens*; sp: *stratum pyramidale*; sr: *stratum radiatum*; slm: *stratum lacunosum-moleculare*; m: capa molecular; g: capa granular; h: hilio.

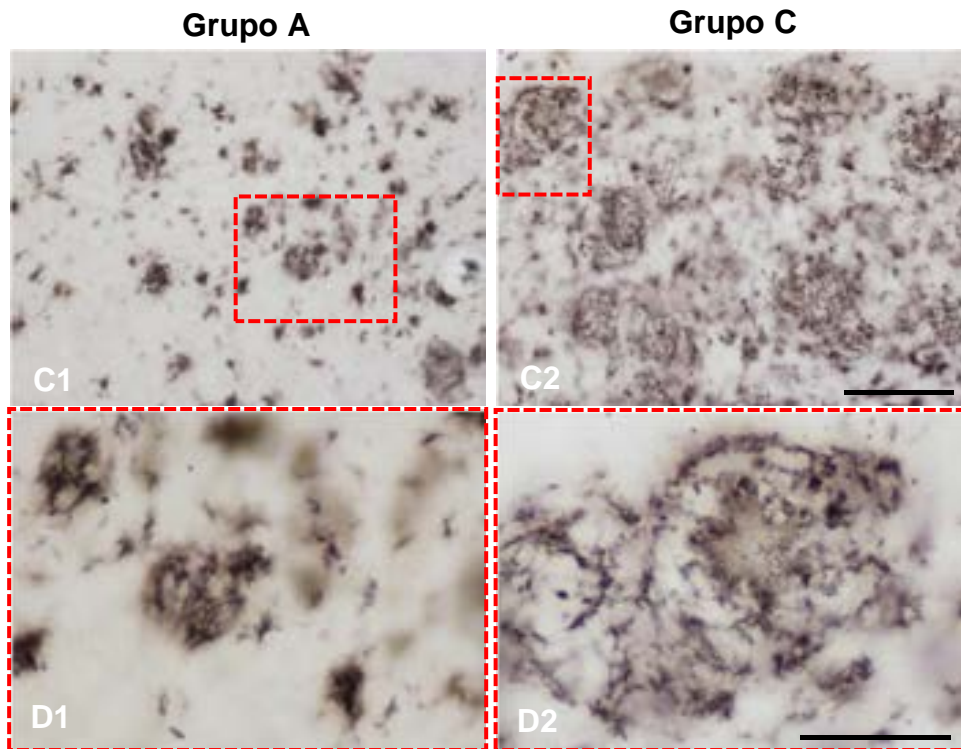
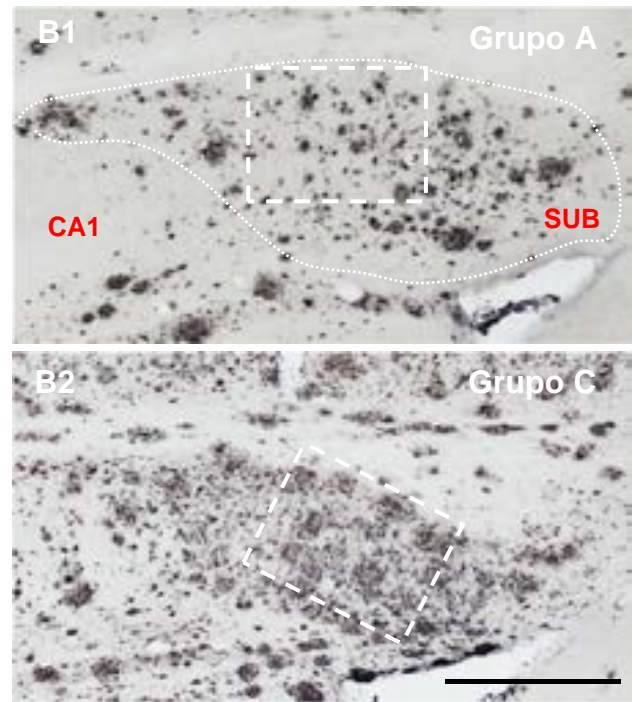
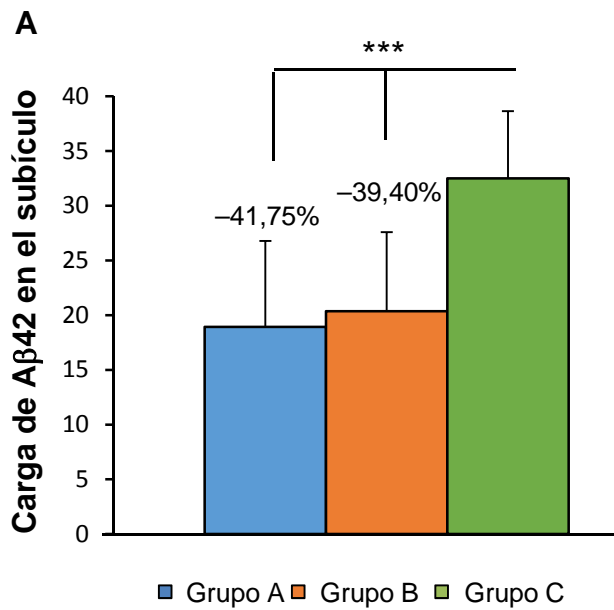


Figura 3.4.7. El tratamiento con NST0037 reduce la carga amiloide en el subículo del modelo PS1/APP. A) El tratamiento provocó una disminución significativa en la carga amiloide del *subiculum* comparada con la carga de Aβ42 presente en los animales control (en relación con el grupo C: $-41,75 \pm 22,00\%$ para el grupo A; $-39,40 \pm 16,06\%$ para B). B-D) En la tinción inmunohistoquímica se observa una menor carga amiloide en el grupo A (B1, C1, D1) en comparación con el grupo C (B2, C2, D2). Los datos muestran la media \pm SD y fueron analizados mediante un ADEVA de 1 vía ($F(2,67)=22,81$, $p < 0,0001$), seguido de un *post-hoc* de Tukey, $***p < 0,001$. $n=5-11$ por grupo, 4 secciones por animal. Barras de escala: B1-B2, 500 μm ; C1-C2, 100 μm ; D1-D2, 50 μm . SUB: *subiculum*.

resultados revelaron una marcada disminución en dicha carga ($n=5-11$, 4 secciones/animal; ADEVA de 1 vía, *post-hoc* de Tukey, $***p<0,001$; Fig. 3.4.7A) en los grupos A ($-41,75\pm 22,00\%$) y B ($-39,40\pm 16,06\%$) respecto al grupo C. Del mismo modo a lo que se apreció en el hipocampo, se observa una mayor compactación de las placas en el subículo de los animales tratados y una menor inmunotinción general de esta región (Fig. 3.4.7C-D).

Para complementar el estudio de la patología amiloide se empleó el anticuerpo OC que reconoce las formas oligoméricas del A β y, por tanto, de mayor potencial tóxico (Fig. 3.4.8). Con este inmunomarcaje se encontró, de la misma manera que ya se había observado para el A β fibrilar y el A β 42, una reducción muy notable en la cantidad de depósitos oligoméricos en los animales tratados (se analizó el grupo A como representante de los animales tratados) tanto en el área CA1 del hipocampo (Fig. 3.4.8A1-B1) como en el giro dentado (Fig. 3.4.8A2-B2), indicando que este tratamiento conduce a una menor toxicidad del péptido A β , como se intuía por la menor compactación de las placas inmunoteñidas con A β 42, observada tanto en el hipocampo (Fig. 3.4.5) como en el subículo (Fig. 3.4.7).

3.4.2. Efecto neuroprotector del tratamiento con NST0037

El siguiente paso consistió en analizar el efecto protector del tratamiento, ya que la EA se caracteriza por una pérdida neuronal y sináptica, junto con una patología axonal que se visualiza como neuritas distróficas. Sin embargo, una de las principales limitaciones del uso de modelos animales de la EA es la ausencia de muerte neuronal. No obstante, aunque en este modelo PS1d9/APP no hay una pérdida neuronal masiva, algunas poblaciones muestran déficits significativos, como las catecolaminérgicas del *locus coeruleus* (O'Neil y col., 2007) y las interneuronas del hipocampo (Popovic y col., 2008; Takahashi y col., 2010). Datos no publicados de nuestro grupo, además han puesto de manifiesto que existe una pérdida de interneuronas somatostatina en el hipocampo, y una pérdida de las células colinérgicas de los núcleos basales en este modelo (presente trabajo, ver Apdo. 3.2 de Resultados y Discusión).

3.4.2.1. El tratamiento con NST0037 redujo la acumulación de neuritas distróficas

La presencia de neuritas distróficas constituye, junto con la aparición de los depósitos de A β y los ovillos neurofibrilares, una lesión histopatológica de la EA (Gómez-Isla y col., 2008). Además, esta patología neurítica ha sido reconocida como uno de los primeros indicadores de la enfermedad (Su y col., 1998; Dickson y col., 1999; Dickson y Vickers, 2001), y es también uno de los primeros eventos patológicos que acontecen en los distintos modelos transgénicos del Alzheimer (ver revisión Duyckaerts y col., 2008). Las neuritas distróficas se observan como grandes dilataciones de procesos, principalmente de

OC (A β oligomérico)

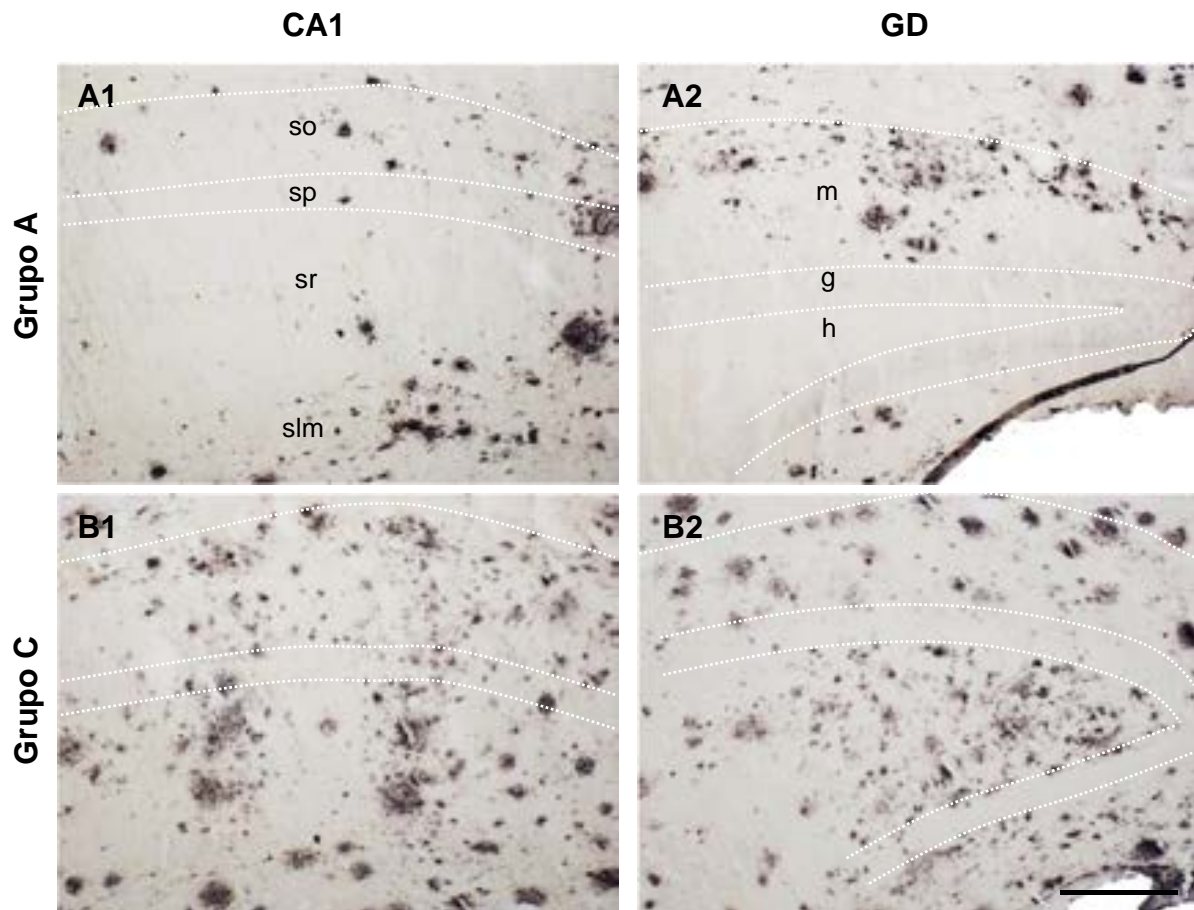


Figura 3.4.8. El tratamiento con NST0037 produce una disminución de los depósitos de Abeta oligomérico. Como se observa para la inmunohistoquímica con el anticuerpo OC (Abeta oligomérico), el grupo A muestra una reducción en la cantidad de depósitos OC-positivos, tanto en CA1 (A1) como en el GD (A2) en comparación con el grupo C (B1 y B2). Barras de escala: 200 μ m. GD: giro dentado; so: *stratum oriens*; sp: *stratum pyramidale*; sr: *stratum radiatum*; slm: *stratum lacunosum-moleculare*; m: capa molecular; g: capa granular; h: hilio.

naturaleza axonal/presináptica, alrededor de las placas amiloides. La existencia de neuritas distróficas apoya la existencia de un proceso neurodegenerativo temprano en este modelo animal.

El inmunomarcaje con el anticuerpo para el fragmento C-terminal de APP, que reconoce tanto la forma completa de la APP como a sus fragmentos C-terminales (CTFs), muestra la localización de APP tanto en el soma como en las porciones proximales de las dendritas apicales de las células piramidales de CA1 (Fig. 3.4.9B), y con menor intensidad en las células granulares del giro dentado (Fig. 3.4.9C). Además, se apreció un intenso marcaje de las fibras musgosas desde la región hilar hasta el *stratum lucidum* de CA3 (Fig. 3.4.9). Se observan, además, neuritas distróficas APP-positivas alrededor de las placas amiloides (detalles en Fig. 3.4.9D), que aumentaban en número y tamaño en los animales no tratados (Fig. 3.4.9B y C). La estrecha asociación existente entre las neuritas distróficas y los depósitos de A β ha sido evidenciada en muestras humanas y en otros modelos transgénicos (Su y col., 1998; Dickson y col., 1999; Woodhouse y col., 2009; Sanchez-Varo y col., 2012; Gowrishankar y col., 2015).

La cuantificación estereológica (tamaño del *frame*: 918,43 μm^2 ; 20% del área escaneada) de la densidad de distrofias APP-positivas (número de neuritas distróficas APP/ mm^3 ; Fig. 3.4.10C) mostró una disminución significativa ($n=5-11$, 4-5 secciones/animal; ADEVA de 1 vía, *post-hoc* de Tukey, $*p<0,05$) en los grupos tratados (con respecto al grupo C: $-44,50\pm 23,10\%$ en el grupo A y $-37,29\pm 22,13\%$ en el grupo B) en el área CA1, que queda patente en las imágenes (Fig. 3.4.10A-B).

El análisis de correlación entre la densidad numérica de las distrofias APP-positivas y la carga amiloide para A β 42 en los tres grupos analizados, reveló una correlación positiva entre ambos parámetros indicando una relación causal entre las placas y el daño axonal (Fig. 3.4.11; $n=5-11$, 5 secciones/animal).

3.4.2.2. El tratamiento con NST0037 redujo la acumulación de vesículas autofágicas en las neuritas distróficas

Para ver la naturaleza autofágica de las vesículas acumuladas en las neuritas distróficas, se realizó una inmunotinción a microscopía óptica para LC3b, ampliamente utilizado como marcador de autofagia. La autofagia (aquí se considerará autofagia a la macroautofagia; ver revisión Arias y Cuervo, 2011) es un proceso en el que se forman vesículas de doble membrana que rodean una porción de citosol (autofagosoma) y que, mediante transporte retrógrado, son dirigidas a fusionarse con los lisosomas (autolisosomas), donde su contenido es digerido. El llamado “flujo autofágico” (Chu, 2006) consiste en el equilibrio entre la formación de los autofagosomas y su posterior eliminación por los lisosomas, de manera que si se produce un incorrecto funcionamiento del tráfico vesicular o de la función lisosomal, las vesículas autofágicas se acumulan,

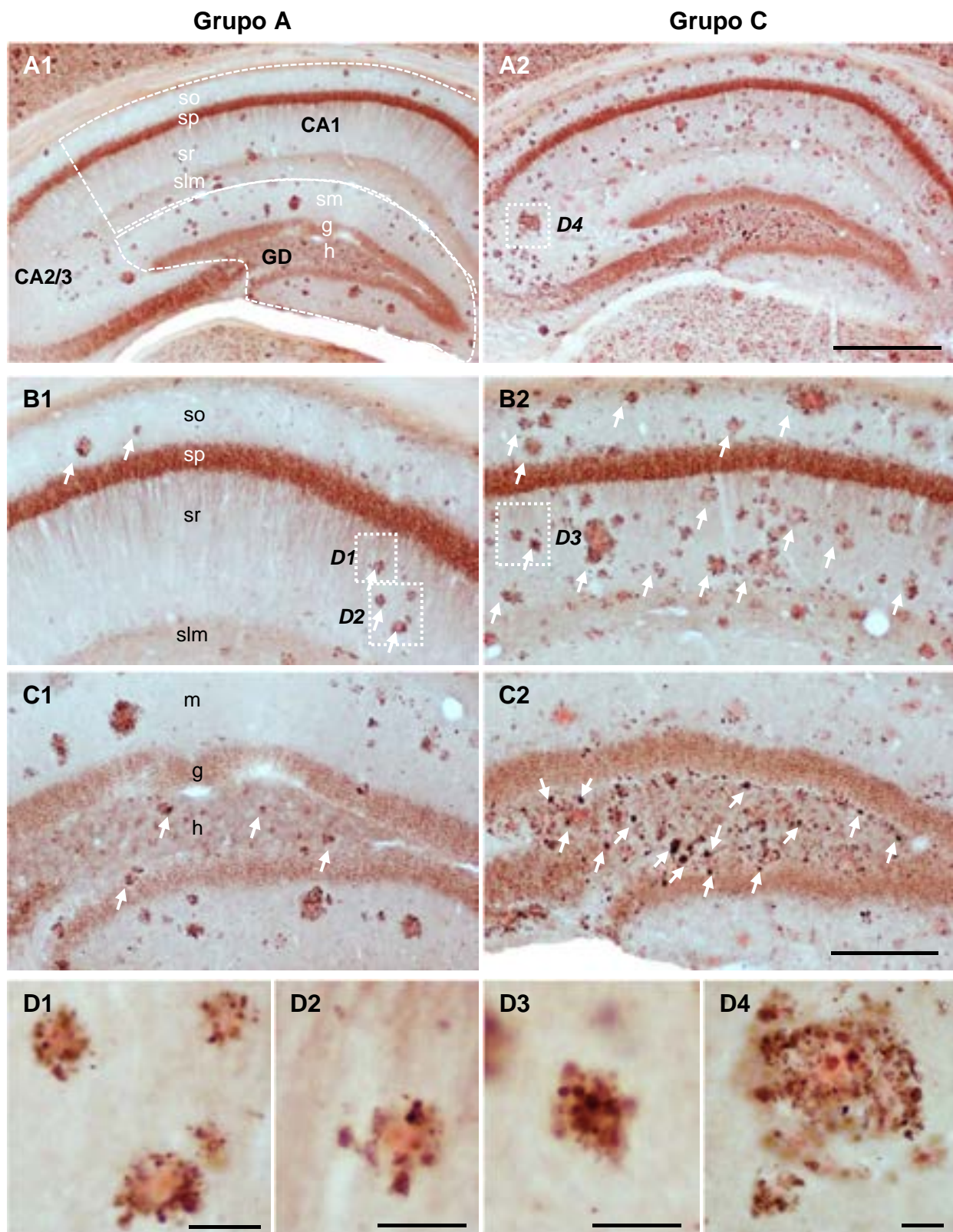


Figura 3.4.9. El tratamiento con la estatina NST0037 reduce la patología axonal asociada a placas. Imágenes representativas de secciones hipocámpales inmunoteciadas con un anticuerpo para APP (contratinción con rojo congo para las placas de A β) de ratones del grupo control (grupo C) y tratados (grupo A). Se observa una reducci3n en el n3mero de placas rojo congo positivas (flechas blancas) y en la cantidad de distrofias APP-positivas que se asocian a dichas placas asociadas con ellas en CA1 (B1-B2) y el GD (C1-C2) del grupo tratado. D) Detalles de placas rodeadas por distrofias APP-positivas. Barras de escala: A, 1000 μ m; B-C, 200 μ m; D, 25 μ m. GD: giro dentado; so: *stratum oriens*; sp: *stratum pyramidale*; sr: *stratum radiatum*; slm: *stratum lacunosum-moleculare*; m: capa molecular; g: capa granular; h: hilio.

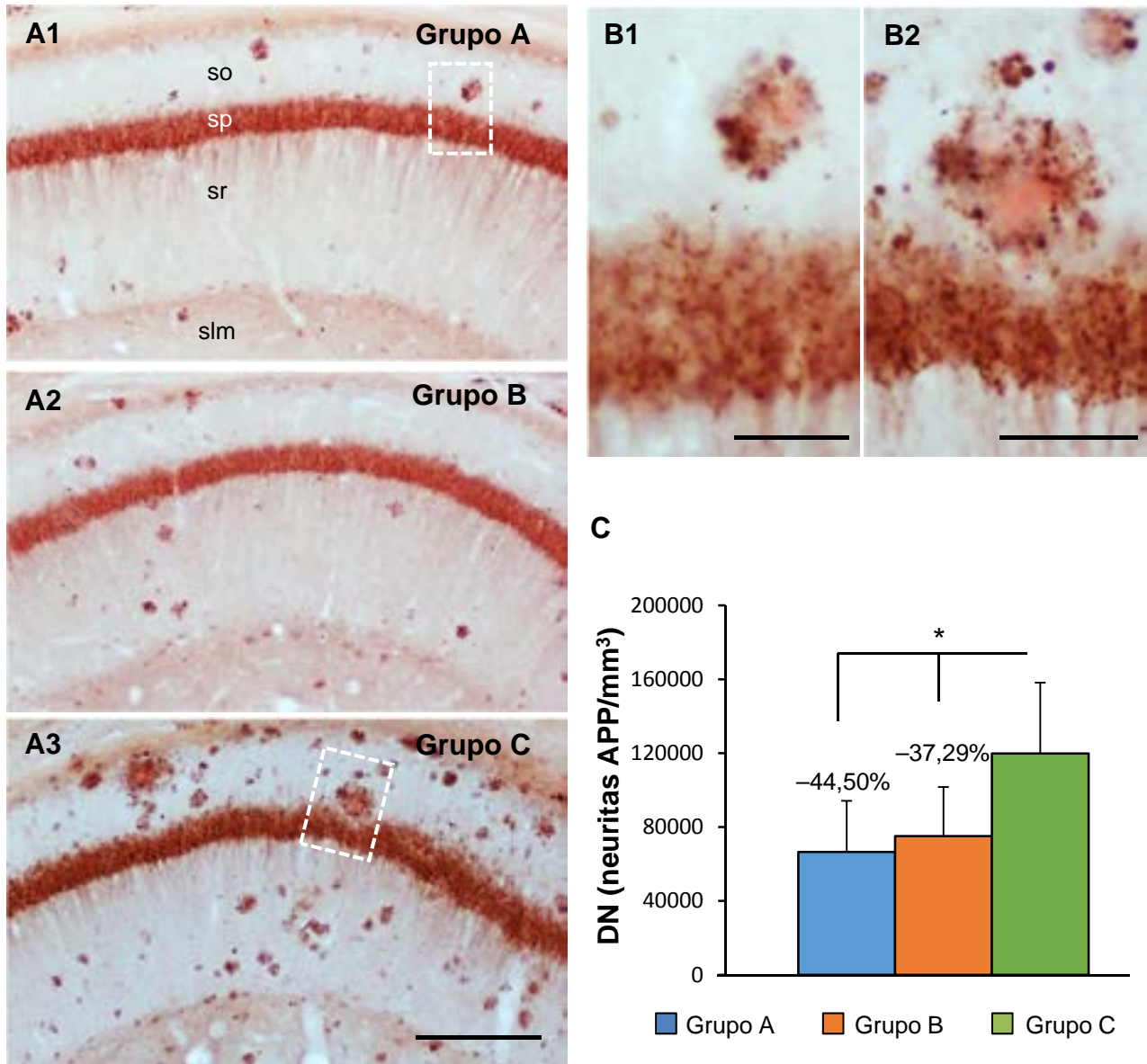


Figura 3.4.10. El tratamiento con NST0037 reduce significativamente la cantidad de distrofias axonales. A-B) Imágenes representativas para el inmunomarcaje con APP (marcador de distrofias) en secciones de CA1 de los grupos A (A1), B (A2) y C (A3). C) La cuantificación estereológica mostró una reducción significativa en la densidad numérica de distrofias APP en los grupos de animales tratados (en relación con el grupo C: $-44,50 \pm 23,10\%$ para el grupo A; $-37,29 \pm 22,13\%$ para C). Los datos se representan como la media \pm SD, y fueron analizados mediante un ADEVA de 1 vía ($F(2,21)=6,297$, $p=0,0072$), seguido de un *post-hoc* de Tukey, $*p<0,05$. $n=5-11$ por grupo, 4-5 secciones por animal. Barras de escala: A, 500 μ m; B, 50 μ m. so: *stratum oriens*; sp: *stratum pyramidale*; sr: *stratum radiatum*; slm: *stratum lacunosum-moleculare*.

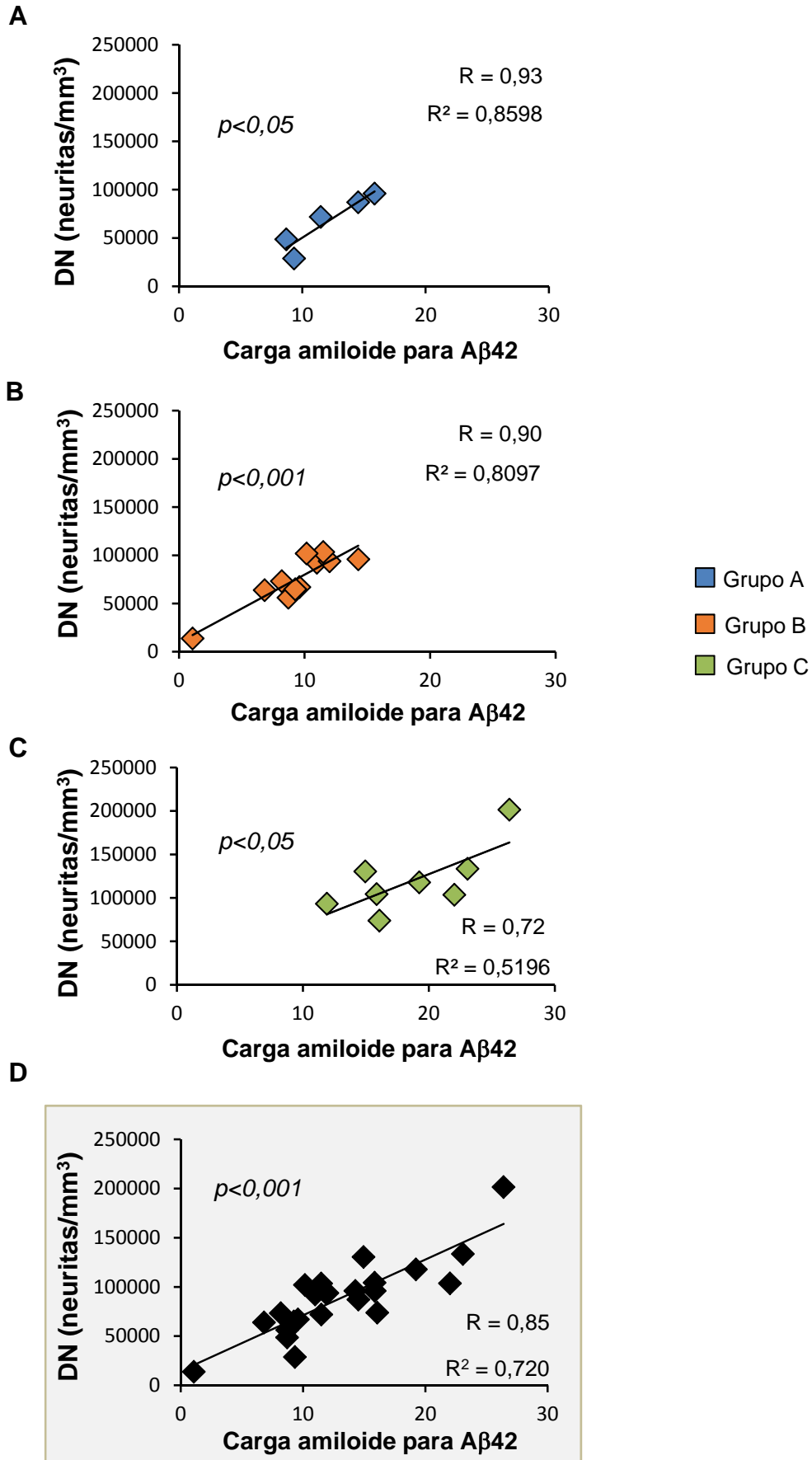


Figura 3.4.11. Correlación positiva entre la carga de Abeta y las distrofias APP.

Figura 3.4.11. Correlación positiva entre la carga de Abeta y las distrofias axonales. El descenso en los grupos tratados de la toxicidad de Abeta se comprueba al representar la cantidad de distrofias APP-positivas de cada animal con su respectiva carga amiloide. A) Datos de carga amiloide y distrofias del grupo A; B) para el grupo B; C) para el grupo C; y D) datos de todos los ejemplares de los diferentes grupos. Los datos individuales de los tres grupos se ajustaron a un modelo lineal indicando que la relación directa existente entre la patología amiloide y la axonal. Es de destacar además la reducción de ambas patologías en los grupos tratados respecto al control. Las diferencias entre grupos fueron analizadas usando un análisis de regresión múltiple. n=5-11 por grupo, 5 secciones por animal.

preferentemente en procesos neuríticos (Nixon y col., 2005; Nixon, 2007; Sanchez-Varo y col., 2012), dando lugar a distrofias positivas para LC3b.

La inmunohistoquímica para esta proteína (Fig. 3.4.12) mostró su localización típica en el soma y en las dendritas apicales de las células principales tanto en el área CA1 del hipocampo (Fig. 3.4.12A), como en la corteza (Fig. 3.4.12B). Además, el marcaje se encontró en axones distróficos en la periferia de las placas de A β (teñidas con rojo congo). Con el tratamiento y la reducción en la carga amiloide, estas neuritas distróficas positivas para LC3b disminuyeron.

Estos resultados junto con los de la reducción en distrofias APP, indican que el tratamiento con esta nueva estatina reduce marcadamente la patología axonal distrófica asociada a placas, junto con una reducción en la acumulación intracelular anormal de vesículas autofágicas en este modelo PS1d9/APP.

3.4.2.3. Efecto neuroprotector del tratamiento con NST0037 sobre la población de interneuronas SOM-positivas

La somatostatina es un tetradecapéptido de amplia distribución en todo el sistema nervioso. La atención se ha centrado especialmente en su función en corteza e hipocampo, por su implicación en funciones cognitivas y en la EA (ver revisión Gillies, 1997). En este sentido existen diversos trabajos que demuestran la disminución en el número de neuronas SOM-positivas en la corteza cerebral de pacientes de la EA (Bea y col., 1986; Chan-Palay, 1987). Todas las neuronas SOM-positivas del hipocampo son interneuronas, en el giro dentado son las denominadas células HIPP (interneuronas del hilo asociadas a la vía perforante, del inglés *hilar interneuron of perforant pathway*), mientras que en CA1, CA2 y CA3 son, principalmente, O-LM (interneuronas del *stratum oriens-lacunosum-moleculare*, cuyos cuerpos celulares se localizan en los *stratum oriens* de CA1-3).

Nuestro grupo ha descrito previamente una marcada reducción de la población de interneuronas SOM-positivas en el hipocampo (Ramos y col., 2006) y corteza entorrinal (Moreno-Gonzalez y col., 2009) de un modelo PS1/APP. Estos datos han sido también corroborados en el modelo PS1d9/APP utilizado en este estudio desde los 6 meses de edad (datos no publicados). Por lo que el siguiente paso consistió en determinar si el tratamiento evitaba esta pérdida neuronal. Para ello, se estudió mediante técnicas inmunohistoquímicas y de RT-PCR el patrón de expresión del neuropéptido SOM en el hipocampo de los tres grupos animales y, posteriormente, se realizó el recuento de la población de interneuronas SOM-positivas mediante técnicas estereológicas.

Como era de esperar, las interneuronas somatostatina se localizaron principalmente en el *stratum oriens* de CA1 y en el hilo del giro dentado (Fig. 3.4.13). El número de perfiles neuronales inmunorreactivos para SOM fue mayor en los grupos tratados A y B en comparación con el grupo C tanto en CA1 como en el GD. Además, se apreció un mayor número de neuritas distróficas SOM-positivas en el grupo control.

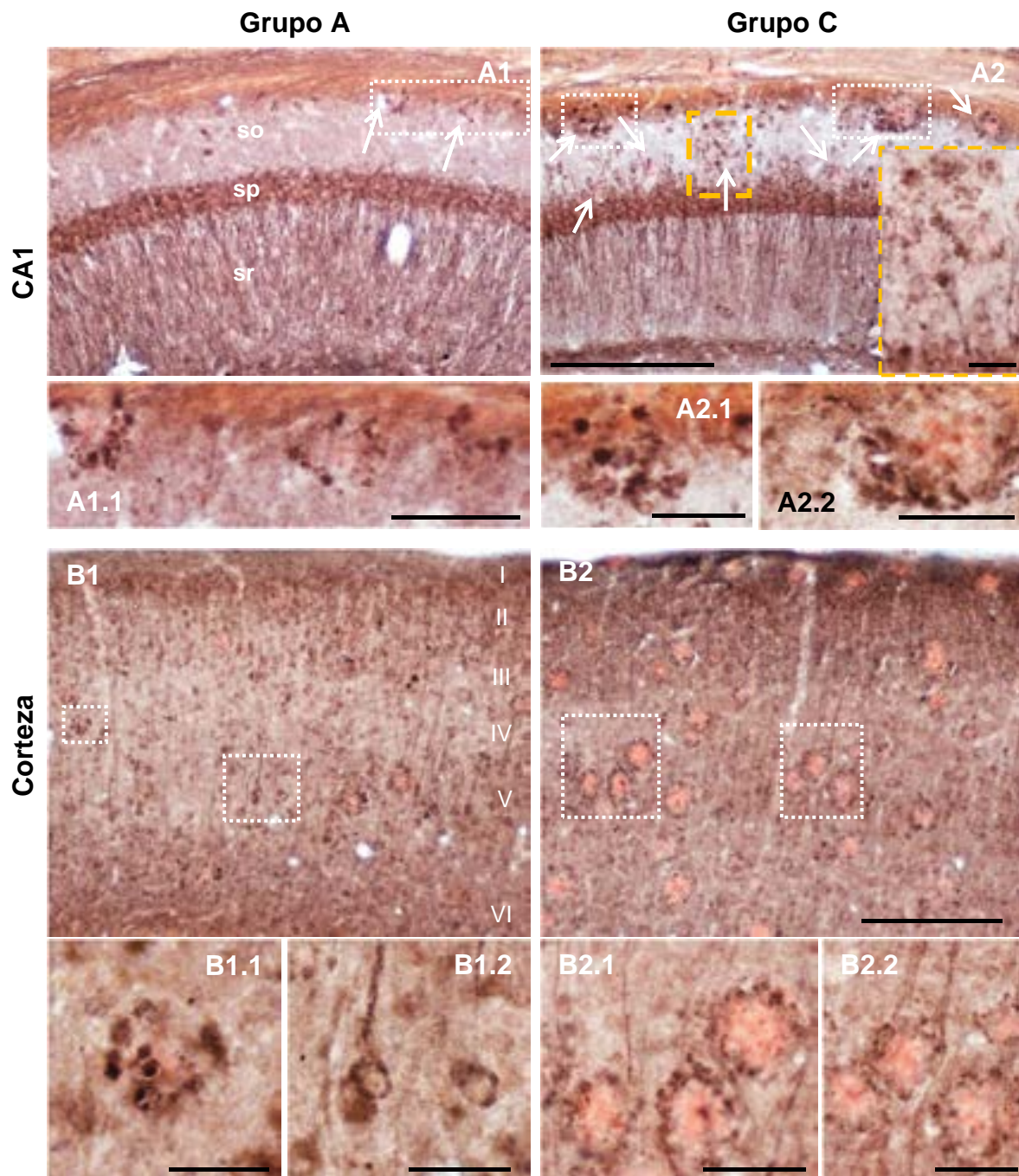


Figura 3.4.12. El tratamiento con NST0037 disminuye la acumulación del marcador de autofagia LC3b en las distrofias axonales asociadas a placas. Secciones hipocampales (A) y corticales (B) inmunoteñidas con LC3 (con contratinción con rojo congo para las placas de Abeta) de animales tratados (A1-B1) y controles (A2-B2). Se observan neuritas distróficas marcadas para LC3 alrededor de las placas de Abeta y como el tratamiento provocó una patente reducción en dicha patología distrófica en el grupo A. Barras de escala: A1-A2 y B1-B2, 200 μ m; A1.1, A2.1, A2.2, B2.1 y B2.2, 50 μ m.; insertos en A2, B1.1 y B1.2, 25 μ m. so: *stratum oriens*; sp: *stratum pyramidale*; sr: *stratum radiatum*; I-VI: capas corticales.

El análisis microscópico de las secciones inmunoteñidas para SOM indicaba que el tratamiento producía un efecto neuroprotector sobre esta población de interneuronas. De hecho la expresión del ARNm para SOM (Fig.3.4.14C; n=5-11 animales/grupo; ADEVA de 1 vía, *post-hoc* de Tukey, *p<0,05) en el grupo A era, prácticamente idéntica, a aquella encontrada en los animales *wild type* (WT). Este efecto protector sobre esta población de interneuronas se demostró mediante cuantificación estereológica (tamaño del *frame*: 926,39 μm^2 ; 30% del área escaneada) de la densidad numérica (células/mm³; Fig. 3.4.14D) de células SOM en el área CA1 del hipocampo propio (células O-LM). La cuantificación estereológica reveló un incremento del 20,11±4,74% (n=5-11, 6-7 secciones/animal; ADEVA de 1 vía, *post-hoc* de Tukey, *p<0,05) de la densidad celular en el grupo A con respecto al grupo control (grupo C). Este incremento queda patente en las imágenes de la inmunohistoquímica para SOM (Fig. 3.4.14A-B), donde la cantidad de perfiles somáticos inmunorreactivos es mayor en el grupo A, mientras que el número de distrofias SOM-positivas es mucho menor.

Como se observa en la Tabla 3.4.1A, a los 6 meses ya existe una pérdida neuronal de células SOM en los animales PS1d9/APP con respecto a animales WT, siendo más patente a los 18 meses. Por tanto, el tratamiento realizado con esta nueva estatina no comercial NST0037 a partir de los 9 meses de edad es posterior al inicio del proceso neurodegenerativo de esta población neuronal. Por ello, en los animales tratados (Tabla 3.4.1B), la densidad de células SOM-positivas no alcanza los niveles de los animales WT. Para proteger por completo esta población de interneuronas sería necesario iniciar el tratamiento antes de que se inicie la muerte celular (6 meses para esta población y modelo).

La densidad numérica para la población de interneuronas SOM-positivas en el grupo C, que recordemos es un transgénico PS1d9/APP de 12 meses sin tratar, fue la esperada a esta edad. Esta afirmación se basa en el hecho de que el dato obtenido (4443,23 células/mm³) es un valor intermedio a los obtenidos previamente por el grupo para este modelo animal a los 6 (5995,92 células/mm³) y 18 (3933,45 células/mm³) meses de edad.

A	DN (células/mm ³)	WT	PS1d9/APP
	6 meses	7595,04 ± 889,26	5995,92 ± 855,37
	18 meses	6764,75 ± 1014,60	3933,45 ± 357,92

B	PS1d9/APP DN (células/mm ³)	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C
	12 meses	5577,25 ± 331,67	5161,55 ± 849,34	4443,23 ± 453,75

Tabla 3.4.1. Datos de densidad numérica (células/mm³) para la población de interneuronas somatostatina. En la tabla A se presentan los valores de DN para los animales WT y PS1d9/APP a los 6 y 18 meses de edad (estos valores corresponden a datos no publicados de nuestro grupo, obtenidos fuera del proyecto realizado con Neuron Bio). Se observa como el valor de DN para el grupo C (tabla B) es intermedio a aquél obtenido en el modelo transgénico a 6 y 18 meses (tabla A; datos resaltados en rojo). La tabla B muestra los resultados obtenidos fruto de este proyecto, con los tres grupos de animales de los que consta.

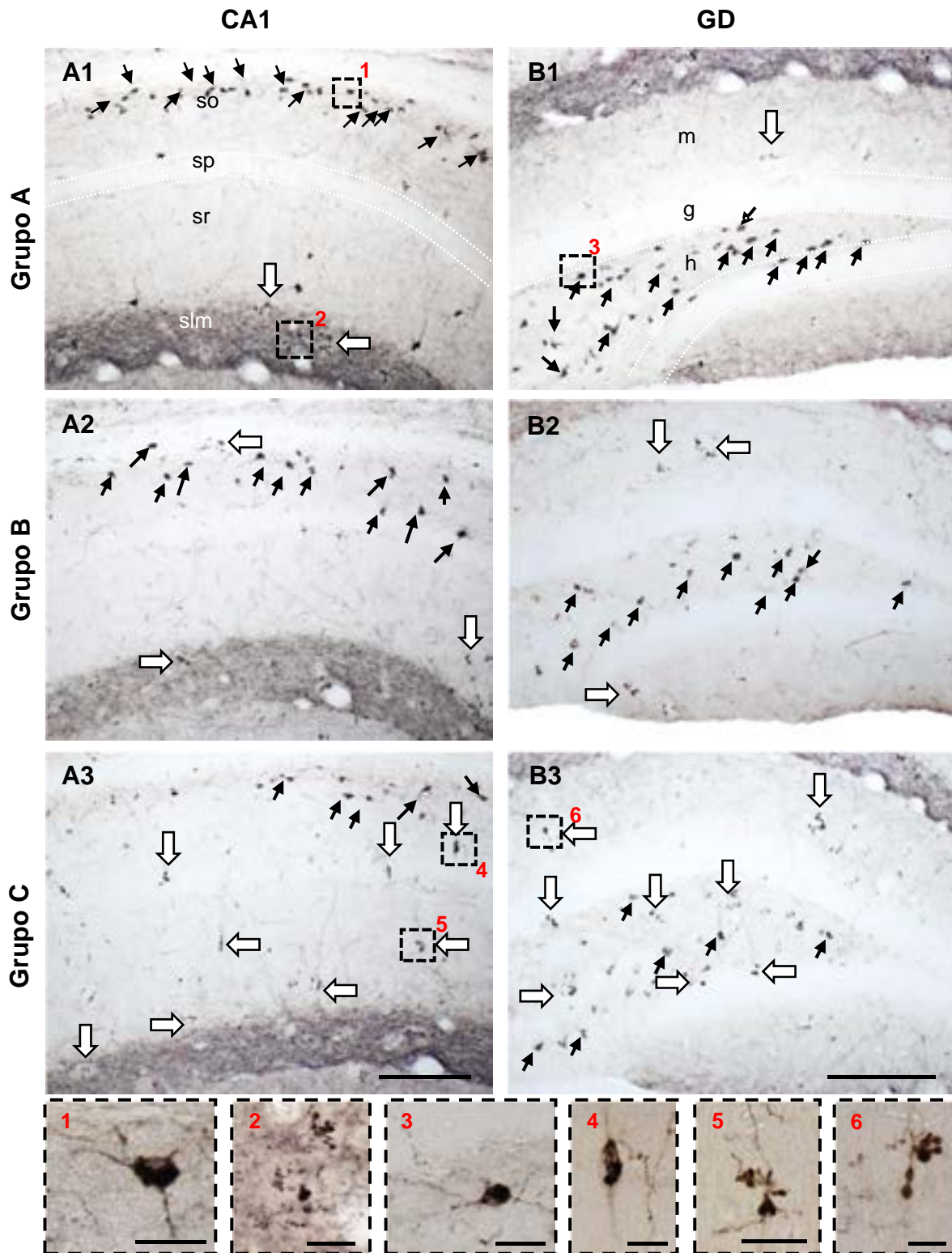


Figura 3.4.13. El tratamiento con NST0037 protege de la pérdida de interneuronas SOM-positivas en el hipocampo de ratones transgénicos. Secciones de CA1 (A) y GD (B) inmunoteñidas para somatostatina de los grupos control y tratados. El número de células SOM (flechas negras) fue considerablemente más alto en los grupos A y B (tratados), mientras que el grupo C mostró más neuritas distróficas SOM-positivas (flechas blancas). Con números se muestran en mayor detalle somas (1 y 3) y distrofias (2, 4-6) inmunorreactivas. Barras de escala: A-B, 200 μ m; detalles, 25 μ m. GD: giro dentado; so: *stratum oriens*; sp: *stratum pyramidale*; sr: *stratum radiatum*; slm: *stratum lacunosum-moleculare*; m: capa molecular; g: capa granular; h: hilio.

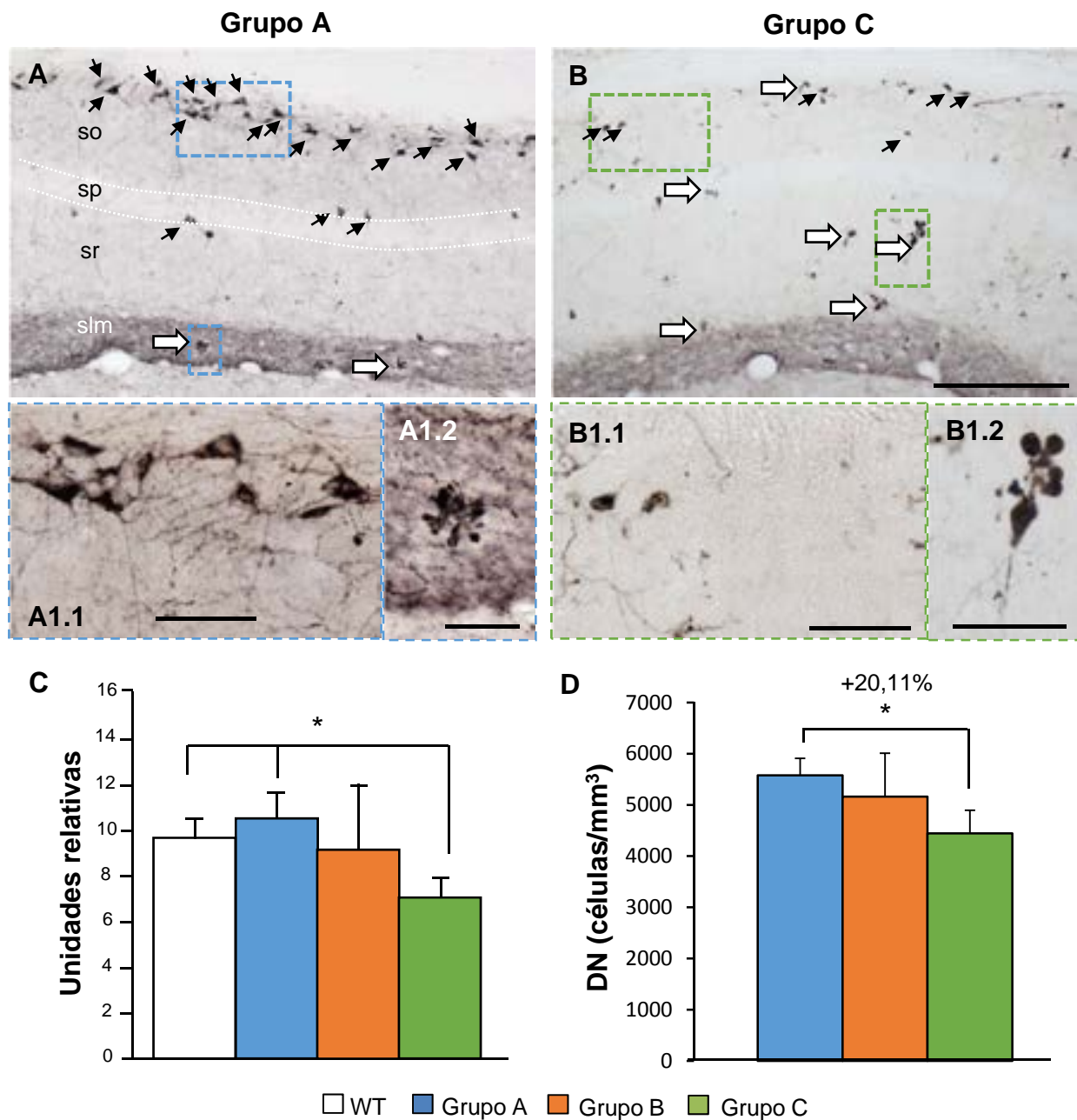


Figura 3.4.14. Estudio cuantitativo del efecto de NST0037 sobre la población de interneuronas SOM-positivas en el hipocampo de ratones transgénicos. A-B) Imágenes de microscopía de campo claro de secciones de CA1 inmunoteñidas para SOM, en el grupo A (A) y C (B). El número de somas SOM-positivas (flechas negras; células O-LM) estaba claramente reducido en el grupo control (B) comparado con el grupo tratado (A); para detalles ver A1.1 y B1.1. El tratamiento provocó una reducción en la patología distrófica para este marcador (flechas blancas; para detalles ver A1.2 y B1.2). C) La expresión (RT-PCR) de SOM era, significativamente, más baja en el grupo C (grupo control; ADEVA de 1 vía $F(3,25)=4,08$, $p=0,017$), mientras que no se observaron diferencias entre los grupos tratados (A y B) y los animales WT. D) La cuantificación estereológica (células/mm³) de las células SOM en el área CA1), mostró un aumento significativo en el grupo tratado A (+20.11±4.74%) con respecto al grupo C: Los datos se representan mediante la media±SD y fueron analizados por un ADEVA de 1 vía ($F(2,20)=4,610$, $p=0,0226$), seguido de un *post-hoc* de Tukey, * $p<0,05$. $n=5-11$ por grupo, 6-7 secciones por animal. Barras de escala: A-B, 200 μm ; A1.1, B1.1 y B1.2, 50 μm ; A1.2, 25 μm . so: *stratum oriens*; sp: *stratum pyramidale*; sr: *stratum radiatum*; slm: *stratum lacunosum-moleculare*.

Por tanto, el tratamiento con el compuesto NST0037 evitó la neurodegeneración de células SOM y mejoró la integridad celular, reduciendo la degeneración axonal.

3.4.2.4. El tratamiento con NST0037 no previene la pérdida de neuronas colinérgicas, aunque sí la formación de distrofias axonales

Como se ha descrito en el Capítulo 3.2 de Resultados y Discusión, existe una pérdida significativa de la población colinérgica en los núcleos basales (*septum* medial, núcleo vertical de la banda diagonal de Broca y núcleo basal de Meynert) de este modelo transgénico PS1d9/APP. Aunque otros autores no han descrito una disminución en el número de células ChAT medido por densidad óptica en las estructuras del telencéfalo basal de este modelo, si se ha descrito una pérdida de actividad de la enzima ChAT en corteza e hipocampo (Pérez y col., 2007) y una reducción de los niveles de acetilcolina (Zhang y col., 2012). Asimismo, se han observado distrofias colinérgicas en corteza e hipocampo a partir de los 2-3 meses de edad (Pérez y col., 2007).

En la Fig. 3.4.15 se observa el patrón de inmunomarcaje del hipocampo con el anticuerpo para ChAT (A), enzima de síntesis de la acetilcolina, colinacetiltransferasa (del inglés *Cholin-Acetyl-Transferase*), apreciándose un plexo sobre la capa piramidal de CA1, como se ha descrito previamente en el Apdo. 3.2 de Resultados y Discusión. Se observan, además, distrofias para este marcador alrededor de las placas (teñidas con rojo congo; Fig.3.4.15B).

Se ha analizado cuantitativamente el plexo de la capa piramidal (n=5-11, 5 secciones/animal; ADEVA de 1 vía, *post-hoc* de Tukey, $p > 0,05$), y no se ha observado ningún cambio con el tratamiento (Fig. 3.4.16A y C). Sin embargo, sí que se ha observado una disminución en las distrofias para ChAT (n=5-11, 5 secciones/animal; ADEVA de 1 vía, *post-hoc* de Tukey, $***p < 0,001$) con el tratamiento. Esta disminución (Fig. 3.4.16B) es más patente en el grupo A ($-53,29 \pm 28,23\%$ con respecto a C) que en el grupo B ($-36,67 \pm 28,48\%$ con respecto a C). La disminución en las distrofias colinérgicas también fue patente en el subículo de estos animales (Fig. 3.4.17) (con respecto al grupo C: $-58,54 \pm 17,51\%$ en el grupo A; $-48,70 \pm 16,24\%$ en el grupo B; n=5-11, 5 secciones/animal; ADEVA de 1 vía, *post-hoc* de Tukey, $***p < 0,001$; Fig. 3.4.17B). Las distrofias se encontraban, predominantemente, alrededor de áreas inmunonegativas, que corresponden a placas amiloides. No obstante, esta disminución en la cantidad de distrofias con el tratamiento no parece prevenir la pérdida de transmisión colinérgica en el plexo yuxtapiramidal de CA1 como ya hemos comentado (Fig. 3.4.16C).

El tratamiento no previene la pérdida neuronal en el núcleo basal de Meynert, ya que la cuantificación estereológica (tamaño del *frame*: $918,43 \mu\text{m}^2$; 40% del área escaneada) de la densidad numérica de esta población (número de células/ mm^3), no mostró cambios significativos entre los tres grupos de estudios (Fig. 3.4.18), mostrando una ausencia de

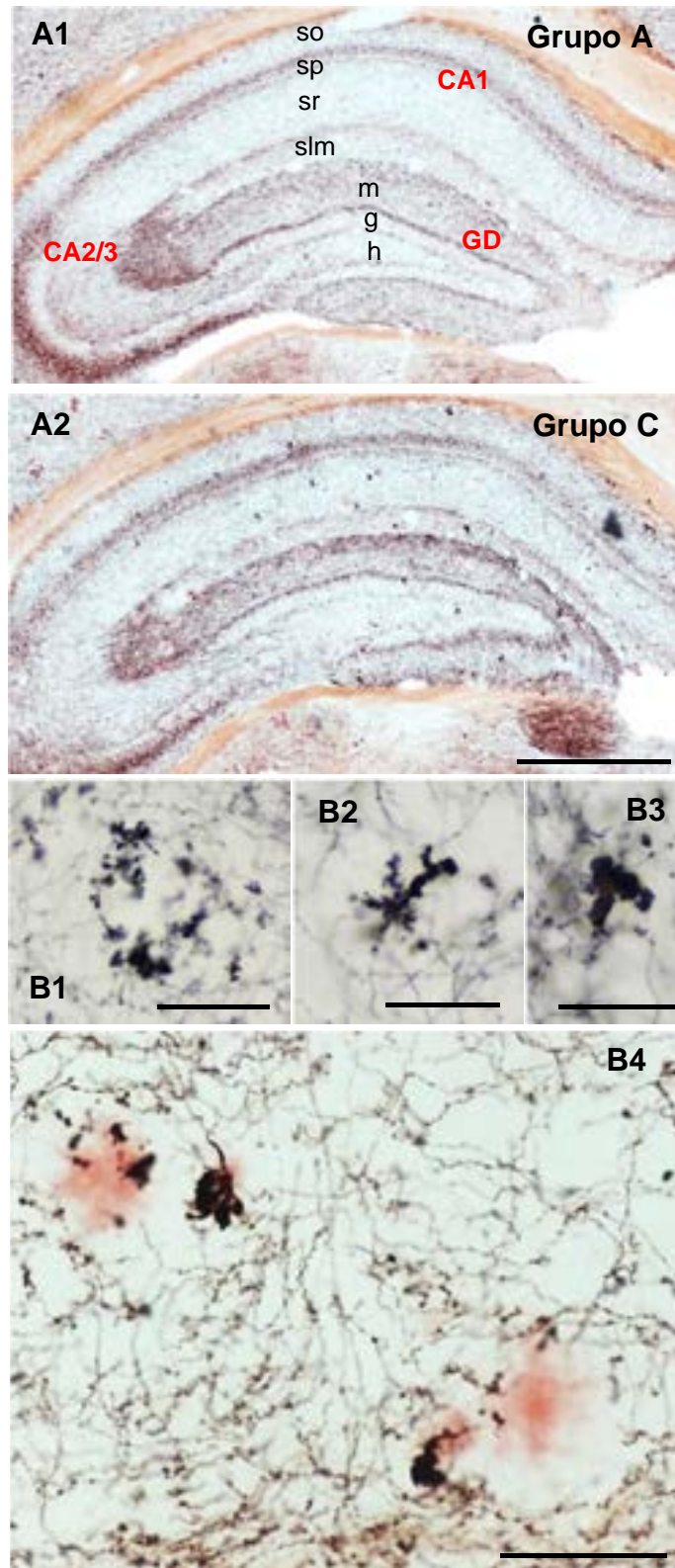


Figura 3.4.15. El tratamiento con NST0037 disminuye la patología axonal colinérgica en el hipocampo. Secciones hipocámpales de los grupos tratados A (A1) y C (A2) inmunoteñidas con un anticuerpo para ChAT. Se observó un descenso en la cantidad de neuritas distróficas para ChAT con el tratamiento. Estas distrofias están localizadas alrededor de las placas de Abeta (teñidas con rojo congo; para detalles ver B). Barras de escala: A, 500 μ m; B1 y B4, 50 μ m; B2 y B3, 25 μ m. GD: giro dentado; so: *stratum oriens*; sp: *stratum pyramidale*; sr: *stratum radiatum*; slm: *stratum lacunosum-moleculare*; m: capa molecular; g: capa granular; h: hilio.

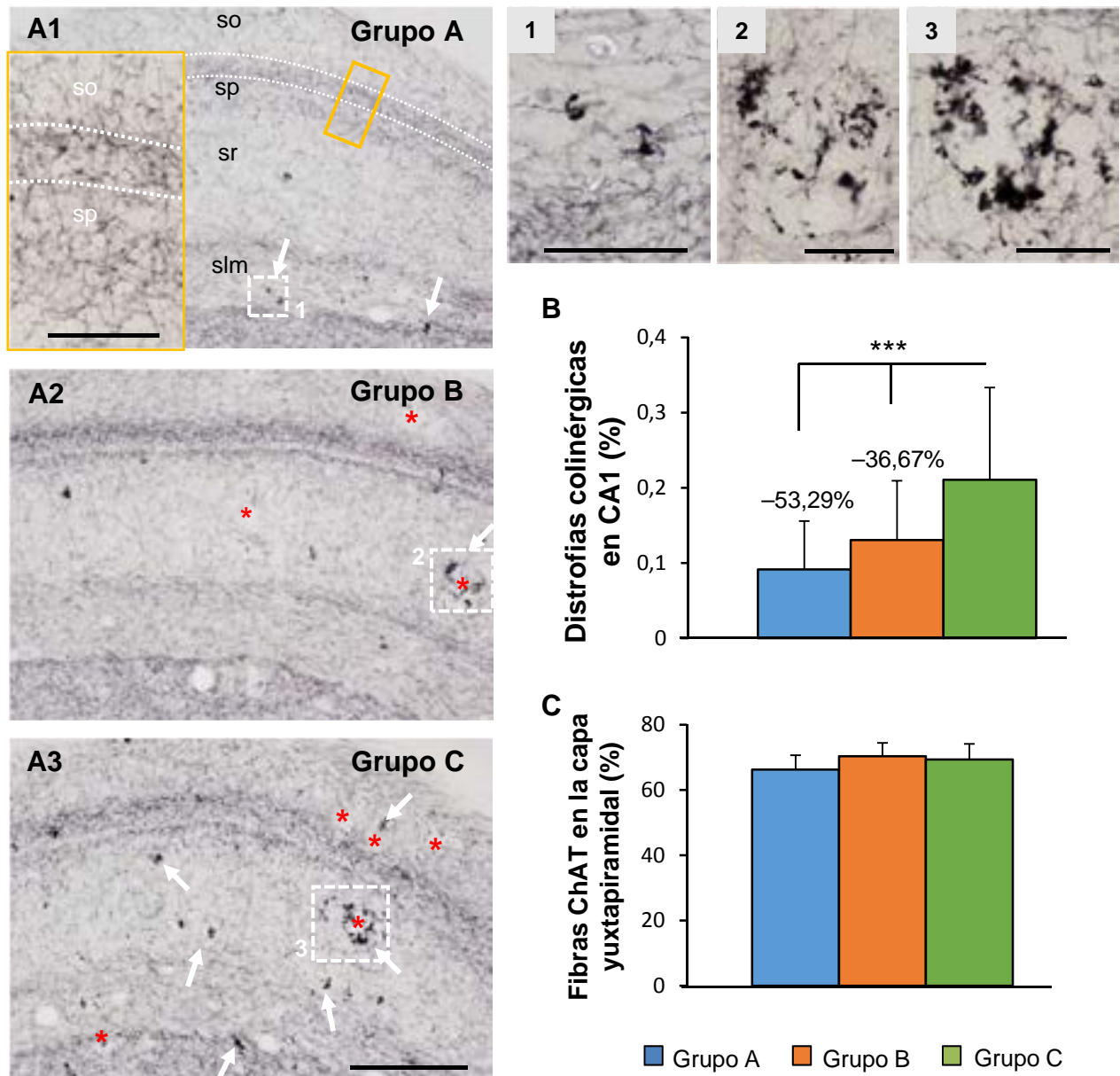


Figura 3.4.16. Estudio cuantitativo de la patología axonal colinérgica en la región de CA1. A) Secciones de CA1 inmunomarcadas con anti-ChAT de animales de grupos tratados (A1-A2) y control (A3). Se observa un descenso en el número de distrofias ChAT-positivas (flechas) con el tratamiento. B) Esta observación fue corroborada cuantitativamente (en relación con el grupo C: $-53,29 \pm 28,23\%$ para el grupo A; y $-36,67 \pm 28,48\%$ para B). C) Sin embargo, no se observaron cambios en el plexo colinérgico localizado en la región yuxtapiamidal del *stratum oriens* de CA1 (detalle inserto en A1, delimitado por la línea blanca). Los datos se representan como la media \pm SD y fueron analizados por un ADEVA de 1 vía (para B, $F(2,114)=14,11$, $p<0,0001$; para C, $F(2,114)=2,730$, $p=0,0695$), seguido de un *post-hoc* de Tukey: para B, $***p<0,001$; para C, $p>0,05$. $n=5-11$ por grupo, 5 secciones por animal. Barras de escala: A, 200 μ m; detalles e inserto en A1, 50 μ m. so: *stratum oriens*; sp: *stratum pyramidale*; sr: *stratum radiatum*; slm: *stratum lacunosum-moleculare*.

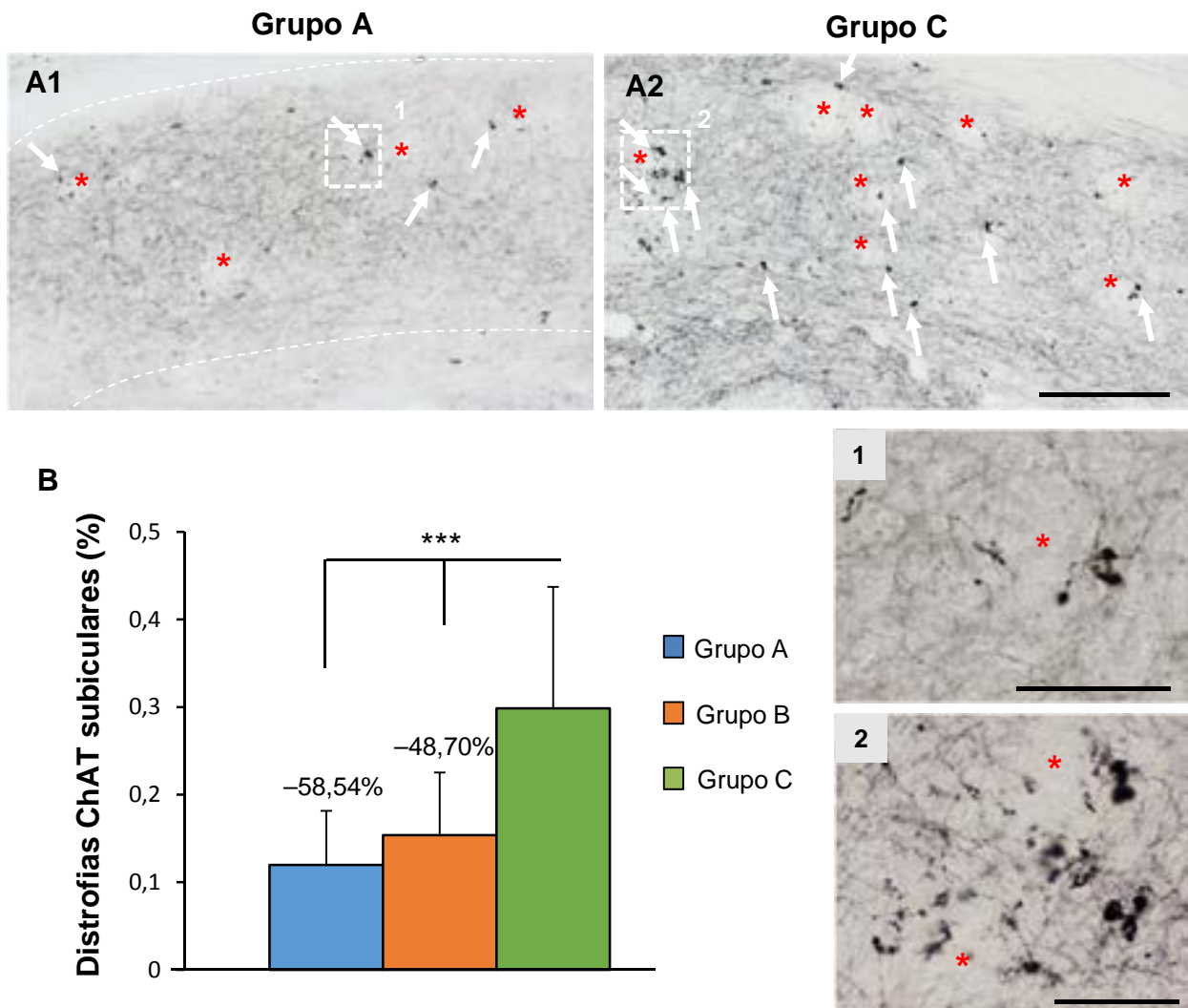


Figura 3.4.17. Estudio cuantitativo de la patología axonal colinérgica en el subículo. A) Se detectó un descenso en el número de distrofias ChAT-positivas (flechas blancas) en los grupos tratados (A1) respecto al grupo control (A2). Las distrofias se disponían alrededor de las placas de Abeta (asteriscos). B) Esta observación fue corroborada por la cuantificación del porcentaje del área subicular ocupadas por distrofias ChAT (en relación al grupo control C: $-58,57 \pm 17,51\%$ en el grupo A; $-48,70 \pm 16,24\%$ en el B). Los datos se representan mediante la media \pm SD y fueron analizados mediante un ADEVA de 1 vía ($F(2,93)=28,49$, $p < 0,0001$), seguido de un *post-hoc* de Tukey, $***p < 0,001$. $n=5-11$ por grupo, 5 secciones por animal. Barras de escala: A, 200 μm ; detalles, 50 μm .

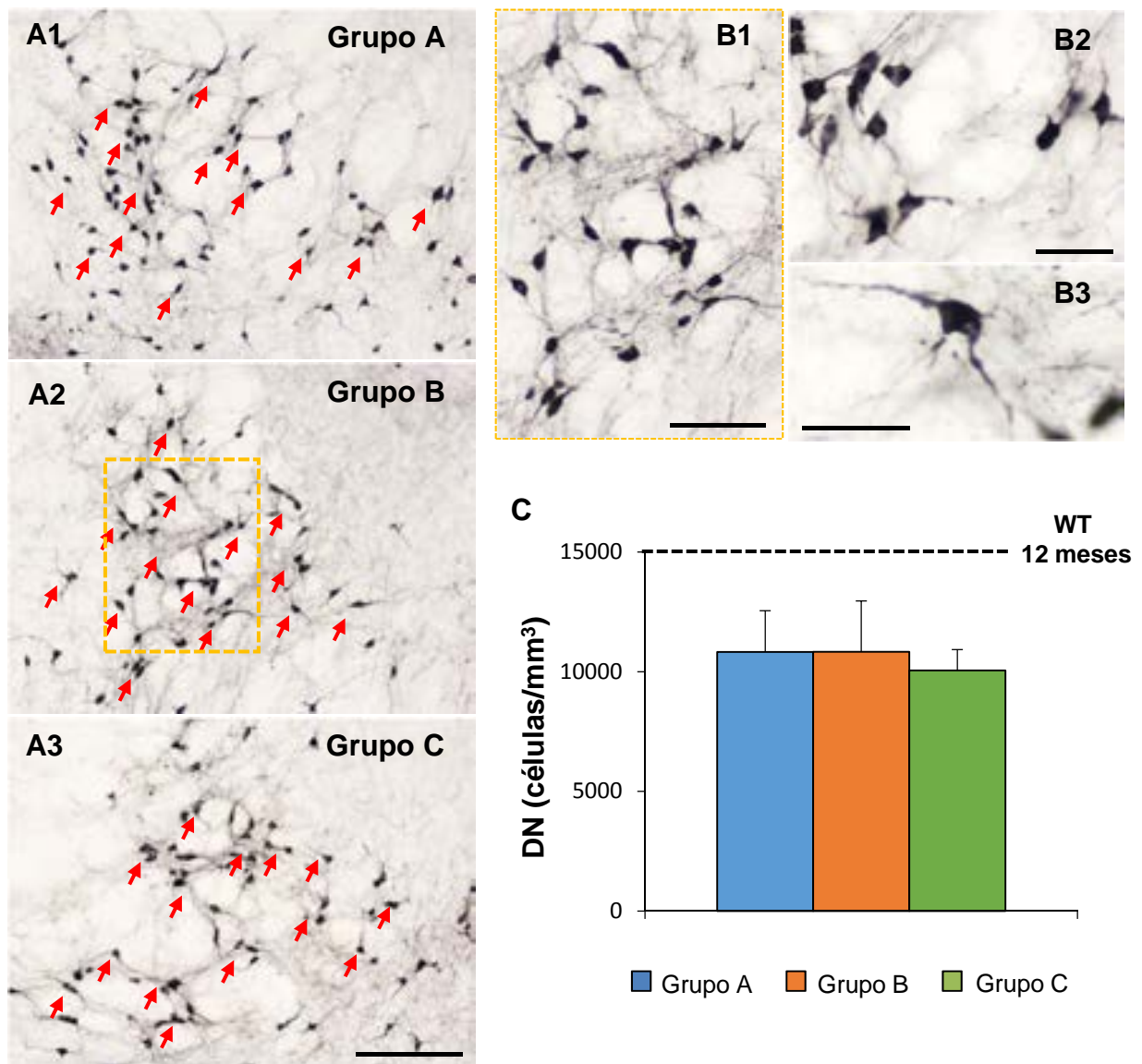


Figura 3.4.18. El tratamiento con NST0037 no protege a la población colinérgica del núcleo basal de Meynert. A-B) Imágenes de microscopía de campo claro de neuronas ChAT en el núcleo basal de Meynert. El número de somas ChAT (flechas blancas; detalles en B) fue similar en los grupos tratados (A1 y A2) y en el grupo control (A3). C) No se detectaron diferencias en la densidad numérica (células/mm³) de células ChAT en el NBM entre los tres grupos de estudios (tratados y sin tratar). La línea discontinua indica el valor de la densidad numérica de las células colinérgicas de los WT de 12 meses (15003,59±1642,47 células/mm³). Los datos se representan como la media±SD, y fueron analizados mediante un ADEVA de 1 vía ($F(2,19)=0,4104$, $p=0,6692$), seguido de un *post-hoc* de Tukey, $p>0,05$. $n=5-11$ por grupo, 2 secciones por animal. Barras de escala: A, 200 μm ; B1, 100 μm ; B2-B3, 50 μm .

efecto neuroprotector de este tratamiento sobre la población colinérgica (n=5-11, 2 secciones/animal; ADEVA de 1 vía, *post-hoc* de Tukey, $p>0,05$). No obstante, es de destacar, que las células del NBM proyectan a la corteza y no al hipocampo, aunque es de esperar que no haya diferencias en las células del SM y de VDB (que proyectan a hipocampo), pues no hay diferencias de comportamiento entre los diferentes núcleos colinérgicos del telencéfalo basal analizados en el Capítulo 3.2 de Resultados y Discusión. En este caso, solo hemos podido analizar la población colinérgica del NBM debido a que solo disponemos de hemisferios sagitales para inmunohistoquímica, ya que el otro hemisferio fue destinado a los estudios moleculares. El corte por la línea media del cerebro para obtener dos hemisferios daña la zona del *septum* medial y no puede ser utilizada para estudios microscópicos.

DISCUSIÓN

Numerosos estudios epidemiológicos y clínicos en pacientes tratados con estatinas han mostrado una reducción en el riesgo de padecer Alzheimer y demencia (ver revisiones Silva y col., 2013; Barone y col., 2014; Wood y col., 2014). Además, pacientes de la EA tratados con estatinas han presentado una mejora de la función cognitiva y de las marcas neuropatológicas de la enfermedad, como las placas neuríticas y los NFTs (Sparks y col., 2006; Li y col., 2007). Hay pruebas de que las estatinas pueden tener propiedades pleiotrópicas independientes de su efecto sobre el colesterol, como la inhibición de la producción de intermediarios isoprenoides (Cole y col., 2005), la eliminación de péptidos de A β (Glebov y Wlatter, 2012), efectos sobre la microglía (Kuipers y col., 2006), efectos antioxidantes (Shishehbor y col., 2003) y efectos antiapoptóticos (Zacco y col., 2003; Tanaka y col., 2004). En el presente trabajo hemos demostrado que la administración crónica en la dieta de una nueva estatina (no comercial), redujo significativamente la acumulación extracelular de placas de A β y el proceso neurodegenerativo de ciertas poblaciones neuronales, en el modelo transgénico PS1d9/APP.

La acumulación de A β se considera un evento central en la patología de la EA (Hardy y Selkoe, 2002), ya que, por diversos mecanismos, es capaz de inducir alteraciones neuríticas, pérdida/disfunción sináptica y, finalmente, muerte neuronal. En el modelo PS1d9/APP la aparición de estos depósitos extracelulares de A β sucede a edades muy tempranas (4 meses; Jankowsky y col., 2004; García-Alloza y col., 2006), siendo el hipocampo un área severamente afectada. Además, la aparición de los depósitos amiloides está, en efecto, acompañada de activación glial (Ruan y col., 2009), distrofias axonales (Kurt y col., 2003), déficits cognitivos (Jankowsky y col., 2001; 2004) y de un proceso selectivo de pérdida neuronal (O'Neil y col., 2007; Popovic y col., 2008).

Se ha propuesto que las estatinas podrían funcionar como tratamiento de la EA al afectar al metabolismo del A β , aunque el mecanismo de actuación está todavía por esclarecer. Aquí, hemos mostrado una reducción en la carga amiloide tras el tratamiento con NST0037 en el modelo transgénico PS1d9/APP. Esta reducción en la carga amiloide no se debe a un cambio en el tamaño de las placas sino a un menor número de placas formadas, ya que se cuantificó una menor densidad de placas para cada uno de los rangos de tamaño analizados. En este sentido, hay estudios que han mostrado un descenso en el péptido A β tras el tratamiento con estatinas (Buxbaum y col., 2002; Sjögren y col., 2003); sin embargo, otros estudios no han encontrado este efecto con el tratamiento (Fassbender y col., 2002; Hoglund y col., 2004).

El colesterol está implicado en el procesamiento de APP *in vitro* e *in vivo* (ver revisión Maulik y col., 2013). Así, el tratamiento de un modelo APP con atorvastatina y pitavastatina reduce el número de placas seniles, los déficits cognitivos y las distrofias Tau positivas (Kurata y col., 2011). En este mismo modelo, se ha descrito además, una reducción en los niveles de A β tras el tratamiento con lovastatina, pravastatina y simvastatina (Chauhan y col., 2004; Li y col., 2006). Piermartiri y col. (2010), también mostraron un efecto beneficioso de atorvastatina en la degeneración celular inducida por A β . El tratamiento con simvastatina en el modelo transgénico Tg2576, antes de la deposición del A β (9 meses), también redujo los niveles del péptido, pero no cuando el tratamiento se realizaba una vez que el β -amiloide había comenzado a depositarse en el parénquima cerebral (Li y col., 2006). Del mismo modo, el tratamiento con simvastatina recupera los déficits cognitivos en el modelo J20 sólo si se suministra a edades tempranas (Tong y col., 2012). La simvastatina y lovastatina reducen los niveles de A β 42 y A β 40 intra- y extracelulares *in vitro*. *In vivo*, cobayas tratadas con simvastatina mostraron una fuerte reducción en los niveles de A β 40 y A β 42 cerebrales en el líquido cefalorraquídeo y en homogenizados del cerebro (Fassbender y col., 2001). Sin embargo, Murphy y col. (2010) no encontraron ningún efecto del tratamiento con atorvastatina en los niveles de A β , a pesar de la reducción en los niveles de BACE1.

Neuron Bio ha demostrado que la estatina no comercial NST0037 es más segura que las estatinas comerciales, mostrando niveles de toxicidad menores que, por ejemplo, la simvastatina. Así mismo, la dosis letal 50 es más alta en el caso de NST0037 que en el caso de simvastatina. Además, NST0037 presenta un mayor poder de inactivación de la HMG-CoA reductasa en comparación con la simvastatina y la atorvastatina.

Los mecanismos moleculares por los que el tratamiento con estatinas afecta a los niveles de A β en el cerebro están aún sin esclarecer, ya que se han propuesto diversas vías de actuación: activación de α -secretasa (incremento del procesamiento no amiloidogénico de APP), reducción del procesamiento por β -secretasa (reducción de la vía amiloidogénica de procesamiento de APP), disminución del procesamiento por γ -secretasa, modulación del

tráfico de APP, activación de la degradación del fragmento C-terminal de APP (APP-CTF), un incremento en su eliminación a través de la barrera hematoencefálica o de su eliminación mediada por APOE (Kojro y col., 2001; Chauhan y col., 2004; Cole y col., 2005; Burns y col., 2006; Ostrowski y col., 2007; Zhou y col., 2008; Guardia-Laguarta y col., 2009; Shinohara y col., 2010; Postina, 2012).

Datos procedentes del grupo del Dr. Javier Vitorica (IBIS, Sevilla) en el hipocampo de los mismos animales utilizados en nuestro estudio (a partir de los hemisferios destinados a estudios moleculares), muestran una disminución, medida mediante WB, en los niveles de C99 (Fig. 3.4.19A) y sAPP β (Fig. 3.4.19B) con el tratamiento, que indica un menor procesamiento de APP a través de la vía amiloidogénica, que podría explicar la menor deposición amiloide observada. Una menor cantidad de C99 es debida a un menor procesamiento por BACE1 (β -secretasa), enzima que cataliza la escisión de APP liberando sAPP β y quedando C99 anclado a la membrana. Este menor procesamiento por BACE podría deberse a una menor actividad enzimática o a una menor expresión de esta proteína debido al tratamiento con la estatina. Los niveles de BACE, medidos por WB, no muestran una diferencia significativa entre los tres grupos de estudio (Fig. 3.4.20).

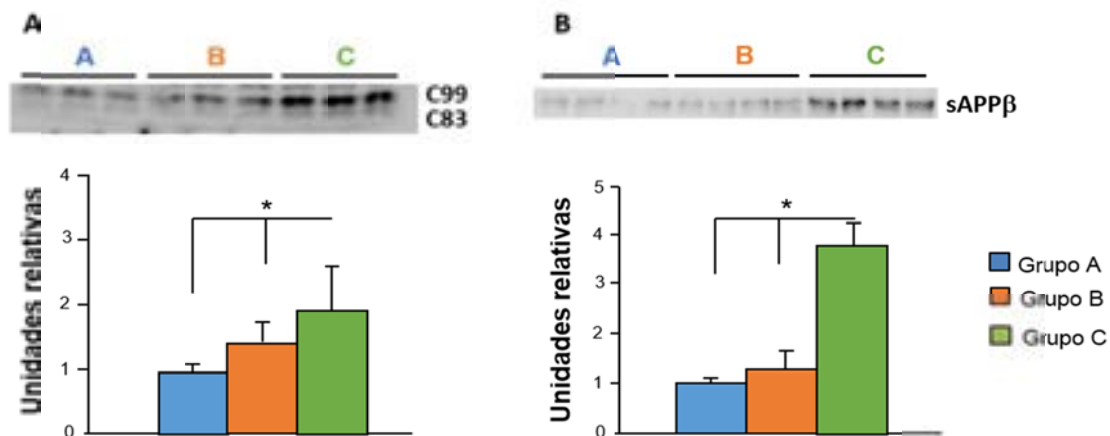


Figura 3.4.19. El tratamiento disminuye el procesamiento de APP a través de la vía amiloidogénica. Mediante WB se ha observado una reducción en los niveles de los péptidos C99 y sAPP β , que podría explicar la disminución en la carga amiloide observada. ADEVA de una vía (C99 $F(2,21)=0.005$, $p=0.005$; sAPP β $F(2,9)=77.23$, $p=0.00001$), *post hoc* Tukey, $*p<0,05$. $n=5-11$ animales/grupo. (Datos cedidos por el grupo del Dr. J Vitorica)

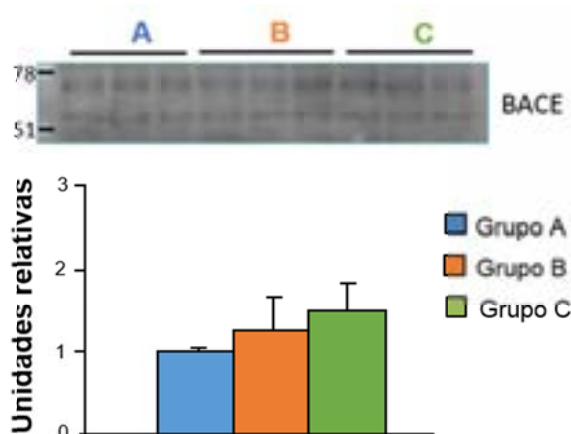


Figura 3.4.20. El tratamiento no afecta a los niveles de β -secretasa. El análisis de los niveles de expresión de BACE mediante WB no reveló ninguna diferencia entre los tres grupos de estudio, por lo que el tratamiento con esta estatina no tiene efecto a nivel de expresión de esta enzima implicada en el procesamiento de APP. $n=5-11$ animales/grupo. (Datos cedidos por el grupo del Dr. Vitorica)

La actividad de γ -secretasa también se encontró afectada por el tratamiento, ya que datos procedentes del laboratorio del Dr. Vitorica, muestran una menor actividad de esta enzima con una reducción en los niveles de AICD (Fig. 3.4.21), que junto con los datos de C99 y sAPP β podría explicar la reducción en la carga amiloide tras el tratamiento.

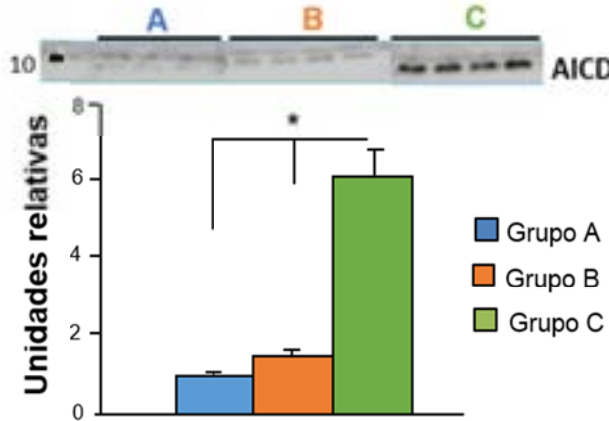


Figura 3.4.21. La estatina disminuye la actividad γ -secretasa. El ensayo de la actividad γ -secretasa se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito previamente (Tamboli y col., 2011; Torres y col., 2012). Mediante WB se determinó la cantidad del producto de su actuación, AICD, usando un anticuerpo anti-APP C-terminal. Esta cuantificación mostró una disminución significativa con el tratamiento. ADEVA de una vía ($F(2,9)=389$, $p=0,005$), *post hoc* Tukey, $*p<0,05$. $n=5-11$ animales/grupo. (Datos cedidos por el grupo del Dr. Vitorica)

Como explicación a esta reducción de la vía amiloidogénica de procesamiento postraduccional de APP (ver Apdo. 1.1.3.3 de la Introducción general) por parte de las estatinas, se ha propuesto el efecto de éstas sobre los niveles de colesterol en las membranas celulares y la distribución preferencial de las enzimas que procesan el APP dentro de las mismas. El colesterol que forma parte de las membranas celulares no se encuentra distribuido uniformemente, sino que se acumula en zonas conocidas como *rafts* lipídicos (dominios pequeños, de 100-200 nm, enriquecidos en esteroides y esfingolípidos, con un papel en una amplia variedad de procesos celulares). Los *rafts* juegan un importante papel en el procesamiento y producción de A β , ya que, mientras que α -secretasa (ADAM10) reside, principalmente, en zonas con bajos niveles de colesterol (Kojro y col., 2001), las enzimas β - y γ -secretasa están localizadas en éstos (Lee y col., 1998; Cordy y col., 2003; Eehalt y col., 2003; Vetrivel y col., 2004; Reid y col., 2007; Hur y col., 2008; Florent-Bécharde y col., 2009; Guardia-Laguarta y col., 2009; Vetrivel y Thinakaran, 2010), por lo que es probable que el componente de colesterol de la membrana pueda modular la producción de A β , su agregación y eliminación. La proteína APP se localiza tanto en los *rafts* como en zonas no enriquecidas en colesterol (Eehalt y col., 2003), de manera que un incremento en los niveles de colesterol puede elevar el porcentaje de *rafts* en las membranas y, consecuentemente, incrementar la actividad/contacto entre APP y BACE1 y γ -secretasa, conduciendo a un incremento en la producción de A β ; mientras que un descenso en los niveles de colesterol podría alterar la integridad de los *rafts* e incrementar el procesamiento no amiloidogénico, por α -secretasa, de APP (Puglielli y col., 2003; ver revisiones McGuinness y Passmore, 2010; Maulik y col., 2013; Silva y col., 2013).

Estudios *in vitro* han mostrado que la reducción del colesterol de la membrana afecta al procesamiento de APP debido a una reducida localización del sustrato en los *rafts*,

causando una disminución en la producción de A β 40 y A β 42 (Simons y col., 1998; Mizuno y col., 1999; Guardia-Laguarta y col., 2009); de la misma manera se ha observado que la producción de A β cerebral *in vivo* es dependiente de colesterol (Sparks y col., 1994; Refolo y col., 2000; ver revisión McGuinness y Passmore, 2010).

Los *rafts* lipídicos también se han asociado con la conversión del péptido A β a su forma neurotóxica (oligómeros de A β). De hecho, los oligómeros aislados de pacientes de la EA se encuentran asociados con los *rafts* (Schneider y col., 2006). Así, hay estudios que muestran que el descenso en los niveles de colesterol puede ser protector, mientras que su incremento puede llevar a una vulnerabilidad celular a la toxicidad del A β (ver revisión Maulik y col., 2013). Esto podría explicar la menor cantidad de A β oligomérico detectado con el tratamiento en este trabajo.

Otros trabajos han mostrado cambios en la composición lipídica de la membrana durante la enfermedad de Alzheimer (Fraser y col., 2010) y como compuestos lipídicos pueden modular dicha composición y disminuir la generación de A β en cultivos celulares y la carga amiloide en un modelo animal de la enfermedad (Torres y col., 2014).

Otra posible vía de actuación de las estatinas es a través de la reducción de los intermediarios isoprenoides (ver Fig. 3.4.1). La isoprenilación consiste en la unión covalente de farnesil pirofosfato (FPP) y geranyl geranylpirofosfato (GGPP) a otras moléculas y es esencial para el tráfico intracelular de proteínas y el anclaje a la membrana (Rando, 1996; Buhaescu e Izzedine, 2007). Eckert y col. (2009), encontraron que los niveles de GGPP y FPP estaban incrementados en los cerebros de pacientes de la EA; asimismo, la expresión génica de sus respectivas sintetas también está elevada en los cerebros de Alzheimer (ver revisión Wood y col., 2014). Se sabe que GGPP estimula el procesamiento de APP a través de γ -secretasa, incrementando la secreción de A β (Cordy y col., 2003; Cole y Vassar, 2006; Ostrowski y col., 2007; Reid y col., 2007; Hur y col., 2008; Zhou y col., 2008; Guardia-Laguarta y col., 2009; Vetrivel y Thinakaran, 2010; ver revisiones Pac-Soo y col., 2011; Silva y col., 2013). Además, la inhibición de la isoprenilación interfiere con el tráfico de APP, haciendo que haya menos sustrato disponible. En este sentido, la inhibición de la prenilación de Rab, por el tratamiento con estatina, interfiere con el tráfico de APP en el retículo endoplasmático, mientras que la inhibición de la isoprenilación de Rho, por su parte, resulta en una degradación lisosomal del fragmento C-terminal de APP, contribuyendo ambos efectos a una reducción en la producción del β -amiloide (Ostrowski y col., 2007; ver revisión Pac-Soo y col., 2011). Se ha mostrado que la administración de simvastatina, que reduce los niveles de FPP y GGPP estimula la potenciación a largo plazo en el área CA1 del hipocampo (Mans y col., 2012). No obstante, se requiere más investigación en este campo.

Recientemente, se ha identificado un dominio de unión a colesterol dentro del dominio transmembrana de APP (Barrett y col., 2012) y en el fragmento de A β de 22-35

aminoácidos (Di Scala y col., 2013), que proporcionan un mecanismo potencial de interacción entre APP, A β y colesterol, estimulando la producción del péptido β -amiloide (ver revisión Wood y col., 2014).

Por otro lado, cabe la posibilidad de que la disminución de la carga amiloide observada tras el tratamiento aplicado, sea debida a un incremento en la eliminación del A β y no solo a la ya comentada disminución en su producción. El grupo del Dr. Javier Vitorica ha medido los niveles de APOE, obteniéndose con el tratamiento unos niveles similares al presente en los animales WT de la misma edad (Fig. 3.4.22).

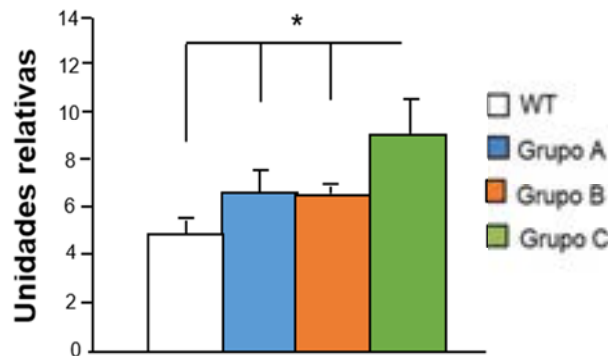


Figura 3.4.22. El tratamiento redujo los niveles de expresión de APOE. El análisis de expresión de APOE mediante PCR, mostró una disminución significativa entre los animales tratados y el transgénico sin tratar (grupo C) y entre éste y los animales control sin tratamiento (WT). ADEVA de una vía ($F(3,18)=16,16$, $p=0,0001$), *post hoc* Tukey, $*p<0,05$. $n=5-11$ animales/grupo. (Datos cedidos por el grupo del Dr. Vitorica)

APOE actúa como un transportador de colesterol en el cerebro y, además, se ha propuesto que actúa como una chaperona que se une directamente al péptido A β modulando su agregación y su deposición o eliminación *in vitro* (Strittmatter y col., 1993) e *in vivo* (Naslund y col., 1995; Vergheze y col., 2011), donde se ha mostrado que es crítico para la formación del A β fibrilar en el parénquima cerebral (Holtzman y col., 2000). Por tanto, una reducción en los niveles de APOE podría explicar la menor deposición del A β fibrilar en el parénquima cerebral observada tras el tratamiento. Otros autores han mostrado previamente que los ratones APP *knockout* para APOE muestran una dramática reducción en los niveles y depósitos de A β fibrilar, sugiriendo un papel de APOE en la deposición amiloide (Bales y col., 1999; Holtzman y col., 2000; Irizarry y col., 2000). APOE no solo afecta al péptido A β , sino que éste actúa como regulador de APOE, incrementando sus niveles celulares (LaDu y col., 2001; Igbavboa y col., 2006), por lo que la reducción del A β , debida al tratamiento, podría explicar la disminución en los niveles de APOE observados en los grupos A y B.

Sería necesario completar el análisis estudiando un posible papel de las estatinas sobre los mecanismos de degradación del A β , entre ellos, deberían ser medidos los niveles y actividad de las enzimas implicadas en la degradación del péptido β -amiloide (neprelisina, IDE, etc.). Así, se ha mostrado que la lovastatina estimula la secreción microglial de la enzima degradadora de insulina (Tamboli y col., 2010). Otro mecanismo de eliminación del péptido implican al receptor de APOE, LRP1 (del inglés *low density lipoprotein receptor-related protein 1*; Puglielli y col., 2003; Bu, 2009; Silva y col., 2013)

y la degradación vía lisosomal. En este sentido, se ha observado una reducción de los niveles de A β y del fragmento C-terminal de APP tras un tratamiento con fluvastatina a ratones C567BL/6, que sería revertido tras la inyección de un inhibidor lisosomal, lo que indica que la degradación lisosomal estaría implicada en la reducción de niveles de A β por el tratamiento con estatina (Shinohara y col., 2010). Asimismo, se ha visto un incremento de LRP1 (que media la eliminación de A β a través de la barrera hematoencefálica) en cultivos de células endoteliales tras el tratamiento con fluvastatina. Por tanto, sería necesario ver el efecto de esta estatina no comercial en los mecanismos de eliminación del A β , como una posible explicación de la reducción observada en la carga amiloide.

El segundo objetivo de este bloque de Resultados ha sido la evaluación del papel neuroprotector del tratamiento efectuado. Como ya se ha comentado, en la EA se produce una pérdida significativa de neuronas y contactos sinápticos en determinadas regiones, que correlaciona con el declive cognitivo. Los ratones transgénicos recapitulan algunas de las características histopatológicas observadas en pacientes de la EA, pero no todas, siendo una de las principales limitaciones de estos modelos la escasa muerte neuronal. Hemos podido ver aquí, que este modelo PS1d9/APP presenta pérdida neuronal, incluyendo a las células SOM del hipocampo y, como vimos en el Capítulo 3.2 de Resultados y Discusión, a las neuronas colinérgicas del telencéfalo basal. Las estatinas tienen acción neuroprotectora en enfermedades neurodegenerativas como la EA, el Parkinson y, probablemente, la esclerosis múltiple y el derrame cerebral, aunque el mecanismo de acción de su efecto neuroprotector es aún desconocido (van der Most y col., 2009).

El efecto neuroprotector de las estatinas comerciales ha sido previamente mostrado en algunos experimentos *in vivo* con modelos. Así, el tratamiento con atorvastatina y pitavastatina evita la pérdida de células de Purkinje en el cerebelo del modelo APP (Kozuki y col., 2011). El tratamiento de simvastatina en una rata modelo de epilepsia inducida por ácido kaínico previene la pérdida neuronal (Sun y col., 2012). La simvastatina y atorvastatina mejora el aprendizaje espacial, evita la pérdida neuronal e incrementa la neurogénesis, la sinaptogénesis y la angiogénesis en ratas con daño cerebral traumático (Lu y col., 2007). El efecto de simvastatina también se ha probado en la enfermedad priónica, obteniéndose un retraso en su desarrollo y efectos neuroprotectores (Haviv y col., 2008).

Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo responsable del efecto neuroprotector de las estatinas. Se han propuesto diferentes vías dadas sus propiedades pleiotrópicas. Así, podría actuar mediante un efecto antiapoptótico (Sun y col., 2012); mediante efectos antioxidantes (Cucchiara y Kasner, 2001); a través de efectos antiinflamatorios (Haviv y col., 2008), reduciendo la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β (Davaro y col., 2014) e incrementando la de citoquinas antiinflamatorias como IL-4 (Clarke y col., 2007); por medio de efectos pro-sinaptogénicos (Chen y col., 2003); modulando la expresión de factores neurotróficos; mediante la sobreexpresión de eNOS y el

subsecuente incremento de NO (Laufs y col., 1998), que puede modular la función sináptica durante la formación de la memoria (Malenka y Nicoll, 1999); o mediante la activación de rutas de señalización como PKB/Akt (Dolga y col., 2009) o Wnt.

En relación con esto último, se ha mostrado que la lovastatina promueve la supervivencia neuronal a través de la inactivación de la actividad de GSK-3 β (que incrementa la expresión de genes relacionados con Wnt y la supervivencia celular; Salins y col., 2007). El tratamiento con simvastatina en el modelo PS1d9/APP evitó el daño en la LTP, con un incremento en la fosforilación de Akt y GSK-3 (Métais y col., 2014), cuya actividad juega un papel central en la inhibición de la LTP (Peineau y col., 2007). Del mismo modo, Li y col. (2006), han mostrado que simvastatina incrementa la memoria y aprendizaje en ratones no transgénicos y en transgénicos Tg2576 de la EA, posiblemente a través de la vía de la Akt, ya que la inhibición de su fosforilación suprime el efecto de simvastatina sobre la LTP *in vitro* (Mans y col., 2010). La simvastatina incrementa la fosforilación de Akt (Kureishi y col., 2001) y esta forma está implicada en la plasticidad sináptica y la consolidación de la memoria en ratas (Sanna y col., 2002; Horwood y col., 2006). Por otro lado, también se ha sugerido un efecto de las estatinas mediante mecanismos dependientes de colesterol, como es la inhabilitación de receptores NMDA al alterar los *rafts* de membrana (Ponce y col., 2003), protegiendo de la excitotoxicidad de la exposición a NMDA (Zacco y col., 2003; Bosel y col., 2005).

En este trabajo hemos demostrado que, específicamente y de gran relevancia para el tratamiento de la EA, esta estatina no comercial consiguió evitar la degeneración neuronal de las interneuronas somatostatina en el hipocampo y que este efecto es específico para determinadas poblaciones neuronales, pues las neuronas colinérgicas del NBM no se ven afectadas en cuanto al número celular.

Las interneuronas SOM constituyen una población altamente vulnerable durante el desarrollo de la EA, como ya se ha descrito en pacientes (Davies y col., 1980; Burgos-Ramos y col., 2008) y en otros modelos transgénicos de la enfermedad (Ramos y col., 2006). La colocalización de SOM con otros marcadores como el Neuropeptido Y (NPY) es muy frecuente (Hendry y col., 1984; Kawaguchi y Kubota, 1997; Gonchar y col., 2008). La población que coexpresa SOM/NPY constituye un grupo muy vulnerable en la EA. Estudios previos de nuestro grupo de investigación han demostrado la pérdida temprana y selectiva de interneuronas SOM/NPY en el hipocampo del modelo transgénico PS1/APP (Ramos y col., 2006) y durante el proceso normal de envejecimiento (Vela y col., 2003). Esta reducción de los niveles de SOM/NPY ha sido confirmada en tejido *post mortem* y en líquido cefalorraquídeo (Davies y col., 1980; Vécsei y Klivenyi, 1995; Van de Nes y col., 2002). El tratamiento con la estatina produjo una recuperación de la expresión del marcador NPY en los animales PS1d9/APP, además de la recuperación en SOM (Fig. 3.4.23).

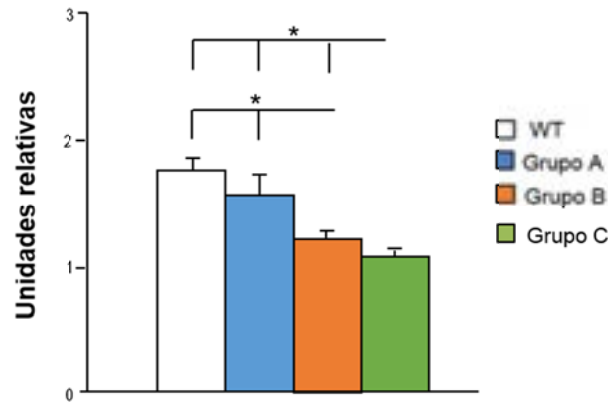


Figura 3.4.23. El tratamiento redujo la pérdida de expresión NPY. La expresión de NPY, medida mediante RT-PCR era significativamente más baja en el grupo C (grupo control) con respecto a los animales *wild-type*, indicando una pérdida de expresión de este neurotransmisor en el modelo transgénico PS1d9/APP. El tratamiento consiguió revertir parcialmente esta pérdida, obteniéndose diferencias significativas entre el grupo C y el grupo con la dosis más alta de tratamiento (grupo A). No obstante, una dosis intermedia (grupo B) no produjo una mejora, ya que el grupo B muestra diferencias significativas con el grupo A y los animales WT. ADEVA de 1 vía ($F(3,25)=57,19$, $p=0,0001$), post hoc Tukey, $*p<0,05$. $n=5-11$ animales/grupo. (Datos cedidos por el grupo del Dr. Vitorica)

Además, la estatina NST0037 también redujo sustancialmente la patología axonal distrófica asociada a la deposición amiloide. Se ha descrito que estas distrofias acumulan Tau, proteínas ubiquitinadas y vesículas autofágicas (Sánchez-Varo y col., 2012; Torres y col., 2012). Nuestros datos demuestran que la administración de la estatina reduce significativamente la formación de distrofias neuronales APP, LC3b, SOM y ChAT asociadas a placas en la formación hipocampal de este modelo transgénico. Este hecho puede ser debido a la menor deposición amiloide ocasionada por el tratamiento y a un posible cambio en la compactación de las placas que las harían menos tóxicas de manera similar a lo comentado con el tratamiento del litio (Capítulo 3.3 de Resultados; Trujillo-Estrada y col., 2013). Para probar esta hipótesis sería necesario hacer aquí también un análisis de la compactación de las placas, ya que el cambio comentado es simplemente cualitativo por el diferente nivel de inmunotinción observado entre los tres grupos.

El mecanismo de neuroprotección de interneuronas SOM queda por elucidar en nuestro caso. A las posibles vías explicadas arriba, se suma la toxicidad del péptido A β . Resultados previos de nuestro grupo demuestran la existencia de una correlación inversa entre la expresión de los niveles SOM y el contenido de A β extracelular en el hipocampo de los animales PS1/APP (Ramos y col., 2006), sugiriendo que el A β extracelular es uno de los factores causantes de la neurodegeneración de las células SOM-positivas. En este sentido, está bien establecida la implicación del péptido β -amiloide como uno de los principales factores responsables de los eventos patogénicos que determinan la muerte neuronal observada en la EA (ver revisión LaFerla y col., 2007). Por tanto, la reducción en la carga amiloide provocada por el tratamiento, podría explicar la menor muerte neuronal observada en los grupos de animales tratados.

Se ha propuesto que los oligómeros solubles de A β son las principales especies tóxicas amiloides (Lambert y col., 1998; Haass y Selkoe, 2007; Martins y col., 2008). Aunque no conocemos hoy en día el mecanismo directo por el cual el A β oligomérico induce la neurodegeneración, los estudios llevados a cabo por otros investigadores apuntan a que podría ocurrir a través de su interacción con los receptores NMDA. La unión A β oligomérico-NMDA desencadenaría una serie de eventos intracelulares que llevarían a un aumento de la vulnerabilidad neuronal (ver revisión Bayer y Wirths, 2010).

Por otro lado, la recuperación de los niveles de SOM podría repercutir sobre los niveles de β -amiloide, ya que este neuropéptido regula la actividad de la enzima neprilisina. Por tanto, una disminución en los niveles de SOM inducía una disminución en la actividad de esta enzima y, consecuentemente, un aumento en los niveles de A β , generando un círculo vicioso, debido a la toxicidad del A β sobre las neuronas, incrementando, seguramente, la vulnerabilidad de las interneuronas SOM-positivas (Saito y col., 2003). Para comprobar si la reducción de los niveles de A β provocada por el tratamiento se debe a este efecto, sería necesario saber si la disminución de SOM en este modelo está implicada en el aumento de A β con la edad, analizando los niveles de expresión de neprilisina o su actividad.

Las estatinas, por tanto, reducen los niveles de A β al afectar al procesamiento de APP conduciendo a una disminución en su producción que resulta en la disminución de la carga amiloide observada. Esto explicaría el fallo del tratamiento en la recuperación del déficit colinérgico, ya que éste, como hemos comentado en el Capítulo 3.2, es dependiente de la mutación de PS1 o TAU y no de la deposición amiloide. No obstante, el tratamiento, aunque no tuvo un efecto sobre la densidad de células colinérgicas en el NBM, sí que disminuyó la presencia de distrofias axonales para ChAT. Este efecto ha sido observado previamente por otros autores, ya que Tong y col. (2009), observaron una reducción de las distrofias colinérgicas asociadas a placas de A β tras el tratamiento del modelo APP con simvastatina, sin que dicho tratamiento afectara a la reducción de las fibras y terminales ChAT observada en la corteza de este modelo. Del mismo modo, no hemos observado un cambio en los terminales colinérgicos de la capa yuxtapiamidal de CA1, a pesar de la reducción de las distrofias axonales, que podría deberse a que el tratamiento no evita la degeneración de las células ChAT en los núcleos del telencéfalo basal.

Por último, el estudio de la función cognitiva mediante el laberinto acuático de Morris de los animales PS1d9/APP tratados con esta nueva estatina (datos no publicados; Neuron Bio) ha revelado una recuperación significativa de la capacidad cognitiva. La pérdida, específica y temprana, de interneuronas GABAérgicas SOM-positivas en el hipocampo de este modelo, podría estar implicada en las deficiencias de memoria y/o aprendizaje características de las fases iniciales de la EA. En apoyo a esta idea, existen

numerosas evidencias de la participación del neuropéptido SOM en los procesos de memoria y aprendizaje.

Específicamente, la SOM modula funciones cognitivas y emotivas, aunque su papel exacto no se conoce bien. Se ha determinado que la administración de SOM mejora la memoria, facilitando el aprendizaje tanto en modelos animales de envejecimiento como en pacientes de la EA (Schettini, 1991; Craft y col., 1999), mientras que su eliminación causa pérdida de memoria debido a la disminución de la LTP (Kluge y col., 2008). De hecho, estudios realizados en ratones *knockout* para el receptor somatostatínérgico SST₂ muestran la existencia de déficits en el aprendizaje espacial (Lamirault y col., 2001). Además, inyecciones intrahipocampales de SOM facilitan la adquisición de estímulos espaciales (Dutar y col., 2002). Se sabe que el envejecimiento está asociado con una reducción en la expresión de los niveles de SOM tanto en humanos (Davies y col., 1980; Beal y col., 1985; Chan-Palay, 1987; Vécsei, 1993; Dournaud y col., 1994; Grouselle y col., 1998; Burgos-Ramos y col., 2008) como en modelos animales. Estos modelos mostraban déficits en el aprendizaje en relación a la disminución de los niveles de SOM (Dournaud y col., 1996; Baraban y Tallent, 2004). Además, la expresión de receptores de somatostatina (SST) está significativamente reducida en esta enfermedad. Esta reducción se correlaciona con un declive cognitivo, sugiriendo que este péptido puede ser crítico en el procesamiento cognitivo. El receptor SST₃ es, además, crítico para la memoria de reconocimiento de objetos en ratones (Einstein y col., 2010). De esta manera, una reducción en los niveles de SOM se encuentra directamente relacionada con déficits cognitivos, apoyando el papel que desempeña este neuropéptido en el aprendizaje. Por lo tanto, los cambios en la señalización mediada por SOM están implicados en los fallos cognitivos tempranos observados en modelos experimentales y también en pacientes de la EA (Matsuoka y col., 1995).

CONCLUSIÓN

Dado que las estatinas tienen relativamente pocos efectos secundarios y son bien toleradas por los pacientes, podrían ser consideradas como fármacos viables en el tratamiento preventivo de enfermedades neurodegenerativas como la EA. Aquí se ha presentado los efectos sobre la progresión de la patología del modelo animal PS1d9/APP de una nueva estatina no comercial (NST0037). Dicho tratamiento ocasiona una disminución bastante significativa de la carga amiloide en el hipocampo, probablemente, debido a una menor producción del péptido A β a través de la acción sobre γ -secretasa. El A β es tóxico para las neuronas, por lo que la reducción en sus niveles explicaría el efecto neuroprotector observado sobre la población de interneuronas SOM-positivas y la menor patología axonal. La protección de las neuronas SOM conlleva la mejora cognitiva observada en los grupos de animales tratados, ya que este neuropéptido está implicado en los procesos de aprendizaje y memoria. No obstante, quedan por dilucidar los mecanismos moleculares de actuación de la estatina.

BIBLIOGRAFÍA

- Arias E, Cuervo AM.** (2011). Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. *Curr Opin Cell Biol.*, 23(2):184-189.
- Bales KR, Verina T, Cummins DJ, Du Y, Dodel RC, Saura J, Fishman CE, DeLong CA, Piccardo P, Petegnief V, Ghetti B, Paul SM.** (1999). Apolipoprotein E is essential for amyloid deposition in the APP(V717F) transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(26):15233-15238.
- Baraban SC, Tallent MK.** (2004). Interneuron Diversity series: Interneuronal neuropeptides--endogenous regulators of neuronal excitability. *Trends Neurosci.*, 27(3):135-142.
- Barone E, Di Domenico F, Butterfield DA.** (2014). Statins more than cholesterol lowering agents in Alzheimer disease: their pleiotropic functions as potential therapeutic targets. *Biochem Pharmacol.*, 88:605-616
- Barrett PJ, Song Y, Van Horn WD, Hustedt EJ, Schafer JM, Hadziselimovic A, Beel AJ, Sanders CR.** (2012). The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol. *Science*, 336(6085):1168-1171.
- Bayer TA, Wirths O.** (2010). Intracellular accumulation of amyloid-beta -a predictor for synaptic dysfunction and neuron loss in Alzheimer's disease. *FNAGI*, 2(8):1-10.
- Beal MF, Mazurek MF, Tran VT, Chattha G, Bird ED, Martin JB.** (1985). Reduced numbers of somatostatin receptors in the cerebral cortex in Alzheimer's disease. *Science*, 229(4710):289-291.
- Bösel J, Gandor F, Harms C, Synowitz M, Harms U, Djoufack PC, Megow D, Dirnagl U, Hörtnagl H, Fink KB, Endres M.** (2005). Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate-induced excitotoxicity in primary cortical neurones. *J Neurochem.*, 92(6):1386-1398.
- Bu G.** (2009). Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci.*, 10(5):333-344.
- Buhaescu I, Izzedin H.** (2007). Mevalonate pathway: a review of clinical and therapeutical implications. *Clin Biochem.*, 40(9-10):575-584.
- Burgos JS, Benavides J, Douillet P, Velasco J, Valdivieso F.** (2012). How statins could be evaluated successfully in clinical trials for Alzheimer's disease? *Am J Alzheimers Dis Other Dem.*, 27(3):151-153.
- Burgos-Ramos E, Hervás-Aguilar A, Aguado-Llera D, Puebla-Jiménez L, Hernández-Pinto AM, Barrios V, Arilla-Ferreiro E.** (2008). Somatostatin and Alzheimer's disease. *Mol Cell Endocrinol.*, 286(1-2):104-111.
- Burns MP, Igbavboa U, Wang L, Wood WG, Duff K.** (2006). Cholesterol distribution, not total levels, correlate with altered amyloid precursor protein processing in statin-treated mice. *Neuromolecular Med.*, 8(3):319-328.
- Burns MP, Rebeck GW.** (2010). Intracellular cholesterol homeostasis and amyloid precursor protein processing. *Biochim Biophys Acta*, 1801(8):853-859.
- Buxbaum JD, Cullen EI, Friedhoff LT.** (2002). Pharmacological concentrations of the HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin decrease the formation of the Alzheimer beta-amyloid peptide in vitro and in patients. *Front Biosci.*, 7:50-59.
- Chan-Palay V.** (1987). Somatostatin immunoreactive neurons in the human hippocampus and cortex shown by immunogold/silver intensification on vibratome sections: coexistence with neuropeptide Y neurons, and effects in Alzheimer-type dementia. *J Comp Neurol.*, 260(2):201-223.
- Chauhan NB, Siegel GJ, Feinstein DL.** (2004). Effects of lovastatin and pravastatin on amyloid processing and inflammatory response in TgCRND8 brain. *Neurochem Res.*, 9(10):1897-911.
- Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang Y, Wang L, Jiang H, Zhang C, Lu M, Katakowski M, Feldkamp CS, Chopp M.** (2003). Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke. *Ann Neurol.*, 53(6):743-51.
- Chu CT.** (2006). Autophagic stress in neuronal injury and disease. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 65(5):423-432.
- Claeyssen S, Cochet M, Donneger R, Dumuis A, Blockaert J, Giannoni P.** (2012). Alzheimer culprits: cellular crossroads and interplay. *Cell Signal.*, 24(9):1831-1840.
- Clarke RM, O'Connell F, Lyons A, Lynch MA.** (2007). The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, attenuates the effects of acute administration of abeta42 in the rat hippocampus in vivo. *Neuropharmacology*, 52:136-145.
- Cole SL, Grudzien A, Manhart IO, Kelly BL, Oakley H, Vassar R.** (2005). Statins cause intracellular accumulation of amyloid precursor protein, beta-secretase-cleaved fragments, and amyloidbeta-peptide via an isoprenoid-dependent mechanism. *J Biol Chem.*, 280(19):18755-18770.
- Cole SL, Vassar R.** (2006). Isoprenoids and Alzheimer's disease: a complex relationship. *Neurobiol Dis.*, 22(2):209-222.
- Cordy JM, Hussain I, Dingwall C, Hooper NM, Turner AJ.** (2003). Exclusively targeting beta-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates beta-site processing of the amyloid precursor protein. *PNAS*, 100(20):11735-11740.
- Craft S, Asthana S, Newcomer JW, Wilkinson CW, Matos IT, Baker LD, Cherrier M, Lofgreen C, Latendresse S, Petrova A, Plymate S, Raskind M, Grimwood K, Veith RC.** (1999). Enhancement of memory in

- Alzheimer disease with insulin and somatostatin, but not glucose. *ArchGen Psychiatry*, 56(12):1135-40.
- Cucchiara B, Kasner SE.** (2001). Use of statins in CNS disorders. *J Neurol Sci.*, 187(1-2):81-89.
- Czech C, Forstl H, Hentschel F, Monning U, Besthorn C, Geiger-Kabisch C, Sattel H, Masters C, Beyreuther K.** (1994). Apolipoprotein E-4 gene dose in clinically diagnosed Alzheimer's disease: prevalence, plasma cholesterol levels and cerebrovascular change. *EurArch Psychiatry ClinNeurosci.*, 243:291-2.
- Davaro F, Forde SD, Garfield M, Jiang Z, Halmen K, Tamburro ND, Kurt-Jones E, Fitzgerald KA, Golenbock DT, Wang D.** (2014). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitor (statin)-induced 28-kDa interleukin-1 β interferes with mature IL-1 β signaling. *J Biol Chem.*, 289(23):16214-16222.
- Davies P, Katzman R, Terry RD.** (1980). Reduced somatostatin-like immunoreactivity in cerebral cortex from cases of Alzheimer disease and Alzheimer senile dementia. *Nature*, 288(5788):279-80.
- Dickson TC, King CE, McCormack G, Vickers JC.** (1999). Neurochemical diversity of the dystrophic neurites in the early and late stages of Alzheimer's disease. *Exp Neurol.*, 156:100-110.
- Dickson DW, Vickers JC.** (2001). The morphological phenotype of beta-amyloid plaques and associated neuritic changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 105:99-107.
- Di Scala C, Yahi N, Lelièvre C, Garmy N, Chahinian H, Fantini J.** (2013). Biochemical identification of a linear cholesterol-binding domain within Alzheimer's β amyloid peptide. *ACS Chem Neurosci.*, 4(3):509-517.
- Dolga AM, Granic I, Nijholt IM, Nyakas C, van der Zee EA, Luiten PGM, Eisel ULM.** (2009). Pretreatment with lovastatin prevents N-Methyl-D-Aspartate-Induced neurodegeneration in the Magnocellular Nucleus Basalis and behavioral dysfunction. *J Alzheimers Dis.*, 17:327-336.
- Dournaud P, Cervera-Pierot P, Hirsch E, Javoy-Agid F, Kordon C, Agid Y, Epelbaum J.** (1994). Somatostatin messenger RNA-containing neurons in Alzheimer's disease: an in situ hybridization study in hippocampus, parahippocampal cortex and frontal cortex. *Neuroscience*, 61(4):755-764.
- Dournaud P, Jazat-Poindessous F, Slama A, Lamour Y, Epelbaum J.** (1996). Correlations between water maze performance and cortical somatostatin mRNA and high-affinity binding sites during ageing in rats. *Eur J Neurosci.*, 8(3):476-485.
- Dutar P, Vaillend C, Viollet C, Billard JM, Potier B, Carlo AS, Ungerer A, Epelbaum J.** (2002). Spatial learning and synaptic hippocampal plasticity in type 2 somatostatin receptor knock-out mice. *Neuroscience*, 112(2):455-466.
- Duyckaerts C, Potier MC, Delatour B.** (2008). Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol.*, 115:5-38.
- Eckert GP, Hooff GP, Strandjord DM, Igbavboa U, Volmer DA, Müller WE, Wood WG.** (2009). Regulation of the brain isoprenoids farnesyl- and geranylgeranylpyrophosphate is altered in male Alzheimer patients. *Neurobiol Dis.*, 35(2):251-257.
- Ehehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K.** (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol.*, 160(1):113-123.
- Einstein EB, Patterson CA, Hon BJ, Regan KA, Reddi J, Melnikoff DE, Mateer MJ, Schulz S, Johnson BN, Tallent MK.** (2010). Somatostatin signaling in neuronal cilia is critical for object recognition memory. *JNeurosci.*, 30(12):4306-4314.
- Fassbender K, Simons M, Bergmann C, Stroick M, Lutjohann D, Keller P, Runz H, Kuhl S, Bertsch T, von Bergmann K, Hennerici M, Beyreuther K, Hartmann T.** (2001). Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(10):5856-5861.
- Fassbender K, Stroick M, Bertsch T, Ragooschke A, Kuehl S, Walter S, Walter J, Brechtel K, Muehlhauser F, Von Bergmann K, Lütjohann D.** (2002). Effects of statins on human cerebral cholesterol metabolism and secretion of Alzheimer amyloid peptide. *Neurology*, 59(8):1257-58.
- Florent-Bécharde S, Desbène C, Garcia P, Allouche A, Youssef I, Escanyé MC, Koziel V, Hanse M, Malaplate-Armand C, Stenger C, Kriem B, Yen-Potin FT, Olivier JL, Pillot T, Oster T.** (2009). The essential role of lipids in Alzheimer's disease. *Biochimie*, 91(6):804-809.
- Fraser T, Tayler H, Love S.** (2010). Fatty acid composition of frontal, temporal and parietal neocortex in the normal human brain and in Alzheimer's disease. *NeurochemRes.*, 35(3):503-13.
- Garcia-Alloza M, Robbins EM, Zhang-Nunes SX, Purcell SM, Betensky RA, Raju S, Prada C, Greenberg SM, Bacskai BJ, Frosch MP.** (2006). Characterization of amyloid deposition in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol Dis.*, 24(3):516-524.
- Garcia-Alloza M, Subramanian M, Thyssen D, Borrelli LA, Fauq A, Das P, Golde TE, Hyman BT, Bacskai BJ.** (2009). Existing plaques and neuritic abnormalities in APP:PS1 mice are not affected by administration of the gamma-secretase inhibitor LY-411575. *Mol Neurodegener.*, 4:19.
- Gillies G.** (1997). Somatostatin: the neuroendocrine history. *Trends Pharmacol Sci.*, 18(3):87-95.
- Glebov K, Walter J.** (2012). Statins in unconventional secretion of insulin-degrading

- enzyme and degradation of the amyloid- β peptide. *Neurodegener Dis.*, 10(1-4):309-312.
- Gomez-Isla T, Spires T, De Calignon A, Hyman BT.** (2008). Neuropathology of Alzheimer's disease. *Handb Clin Neurol.*, 89:233-243.
- Gonchar Y, Wang Q, Burkhalter A.** (2008). Multiple distinct subtypes of GABAergic neurons in mouse visual cortex identified by triple immunostaining. *Front Neuroanat.*, 1:3.
- Grouselle D, Winsky-Sommerer R, David JP, Delacourte A, Dournaud P, Epelbaum J.** (1998). Loss of somatostatin-like immunoreactivity in the frontal cortex of Alzheimer patients carrying the apolipoprotein epsilon 4 allele. *Neurosci Lett.*, 255(1):21-24.
- Gowrishankar S, Yuan P, Wu Y, Schrag M, Paradise S, Grutzendler J, De Camilli P, Ferguson SM.** (2015). Massive accumulation of luminal protease-deficient axonal lysosomes at Alzheimer's disease amyloid plaques. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112(28):E3699-708.
- Guardia-Laguarta C, Coma M, Pera M, Clarimón J, Sereno L, Agulló JM, Molina-Porcel L, Gallardo E, Deng A, Berezovska O, Hyman BT, Blesa R, Gómez-Isla T, Lleó A.** (2009). Mild cholesterol depletion reduces abeta production by impairing APP trafficking to the cell surface. *J Neurochem.*, 110(1):220-230.
- Haass C, Selkoe DJ.** (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 8(2):101-112.
- Haag MD, Hofman A, Koudstaal PJ, Stricker BH, Breteler MM.** (2009). Statins are associated with a reduced risk of Alzheimer disease regardless of lipophilicity. The Rotterdam Study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 80(1):13-17.
- Hardy J, Selkoe DJ.** (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297:353-356.
- Haviv Y, Avrahami D, Ovadia H, Ben-Hur T, Gabizon R, Sharon R.** (2008). Induced neuroprotection independently from PrPSc accumulation in a mouse model for prion disease treated with simvastatin. *Arch Neurol.*, 65(6):762-75.
- Hendry SH, Jones EG, Emson PC.** (1984). Morphology, distribution, and synaptic relations of somatostatin- and neuropeptide Y-immunoreactive neurons in rat and monkey neocortex. *J Neurosci.*, 4(10):2497-2517.
- Höglund K, Wiklund O, Vanderstichele H, Eikenberg O, Vanmechelen E, Blennow K.** (2004). Plasma levels of beta-amyloid(1-40), beta-amyloid(1-42), and total beta-amyloid remain unaffected in adult patients with hypercholesterolemia after treatment with statins. *Arch Neurol.*, 61(3):333-337.
- Holtzman DM, Fagan AM, Mackey B, Tenkova T, Sartorius L, Paul SM, Bales K, Ashe KH, Irizarry MC, Hyman BT.** (2000). Apolipoprotein E facilitates neuritic and cerebrovascular plaque formation in an Alzheimer's disease model. *Ann Neurol.*, 47(6):739-747.
- Horwood JM, Dufour F, Laroche S, Davis S.** (2006). Signalling mechanisms mediated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade in synaptic plasticity and memory in the rat. *Eur J Neurosci.*, 23(12):3375-3384.
- Hur JY, Welander H, Behbahani H, Aoki M, Franberg J, Winblad B, Frykman S, Tjernberg LO.** (2008). Active g-secretase is localized to detergent-resistant membranes in human brain. *FEBS J.*, 275:1174-1187.
- Igbavboa U, Johnson-Anuna LN, Rossello X, Butterick TA, Sun GY, Wood WG.** (2006). Amyloid beta-protein1-42 increases cAMP and apolipoprotein E levels which are inhibited by beta1 and beta2-adrenergic receptor antagonists in mouse primary astrocytes. *Neuroscience*, 142(3):655-660.
- Irizarry MC, Cheung BS, Rebeck GW, Paul SM, Bales KR, Hyman BT.** (2000). Apolipoprotein E affects the amount, form, and anatomical distribution of amyloid beta-peptide deposition in homozygous APP(V717F) transgenic mice. *Acta Neuropathol.*, 100(5):451-458.
- Jankowsky JL, Slunt HH, Ratovitski T, Jenkins NA, Copeland NG, Borchelt DR.** (2001). Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomol Eng.*, 17:157-65.
- Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Lee MK, Younkin LH, Wagner SL, Younkin SG, Borchelt DR.** (2004). Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum Mol Genet.*, 13:159-170.
- Kawaguchi Y, Kubota Y.** (1997). GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb cortex*, 7(6):476-486.
- Kluge C, Stoppel C, Szinyei C, Stork O, Pape HC.** (2008). Role of the somatostatin system in contextual fear memory and hippocampal synaptic plasticity. *Learn Mem.*, 15(4):252-260.
- Kojro E, Gimpl G, Lammich S, Marz W, Fahrenholz F.** (2001). Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha-secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:5815-5820.
- Kozuki M, Kurata T, Miyazaki K, Morimoto N, Ohta Y, Ikeda Y, Abe K.** (2011). Atorvastatin and pitavastatin protect cerebellar Purkinje cells in AD model mice and preserve the cytokines MCP-1 and TNF-a. *Brain Res.*, 1388:32-38.
- Kuipers HF, Rappert AA, Mommaas AM, van Haastert ES, van der Valk P, Boddeke HW, Biber KP, van den Elsen PJ.** (2006). Simvastatin affects cell motility and actin cytoskeleton distribution of microglia. *Glia*, 53(2):115-123.

- Kurata T, Miyazaki K, Kozuki M, Panin VL, Morimoto N, Ohta Y, Nagai M, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K.** (2011). Atorvastatin and pitavastatin improve cognitive function and reduce senile plaque and phosphorylated tau in aged APP mice. *Brain Res.*, 1371:161-170.
- Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K.** (2001). The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med.*, 6(9):1004-1010.
- LaDu MJ, Shah JA, Reardon CA, Getz GS, Bu G, Hu J, Guo L, Van Eldik LJ.** (2001). Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors modulate Abeta-induced glial neuroinflammatory responses. *Neurochem Int.*, 39(5-6):427-434.
- LaFerla FM, Green KN, Oddo S.** (2007). Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.*, 8:499-509.
- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL.** (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *PNAS*, 95(11):6448-6453.
- Lamirault L, Guillou JL, Micheau J, Jaffard R.** (2001). Intrahippocampal injections of somatostatin dissociate acquisition from the flexible use of place responses. *Eur J Neurosci.*, 14(3):567-570.
- Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK.** (1998). Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation*, 97(12):1129-1135.
- Lee SJ, Liyanage U, Bickel PE, Xia W, Lansbury PT Jr, Kosik KS.** (1998). A detergent-insoluble membrane compartment contains A beta in vivo. *Nat Med.*, 4(6):730-734.
- Lehtonen A, Luutonen S.** (1986). High-density lipoprotein cholesterol levels of very old people in the diagnosis of dementia. *Age ageing*, 15:267-70.
- Li L, Cao D, Kim H, Lester R, Fukuchi K.** (2006). Simvastatin enhances learning and memory independent of amyloid load in mice. *Ann Neurol.*, 60(6):729-739.
- Li G, Larson EB, Sonnen JA, Shofer JB, Petrie EC, Schantz A, Peskind ER, Raskind MA, Breitner JC, Montine TJ.** (2007). Statin therapy is associated with reduced neuropathologic changes of Alzheimer disease. *Neurology*, 69(9):878-885.
- Liu L, Herukka SK, Minkeviciene R, van Groen T, Tanila H.** (2004). Longitudinal observation on CSF Abeta42 levels in young to middle-aged amyloid precursor protein/presenilin-1 doubly transgenic mice. *Neurobiol Dis.*, 17:516-523.
- Lu D, Qu C, Goussev A, Jiang H, Lu C, Schallert T, Mahmood A, Chen J, Li Y, Chopp M.** (2007). Statins increase neurogenesis in the dentate gyrus, reduce delayed neuronal death in the hippocampal CA3 region, and improve spatial learning in rat after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, 24(7):1132-1146.
- Malenka RC, Nicoll RA.** (1999). Long-term potentiation--a decade of progress? *Science*, 285(5435):1870-1874.
- Mans RA, Chowdhury N, Cao D, McMahon LL, Li L.** (2010). Simvastatin enhances hippocampal long-term potentiation in C57BL/6 mice. *Neuroscience*, 166(2):435-444.
- Mans RA, McMahon LL, Li L.** (2012). Simvastatin-mediated enhancement of long-term potentiation is driven by farnesyl-pyrophosphate depletion and inhibition of farnesylation. *Neuroscience*, 202:1-9.
- Martins IC, Kuperstein I, Wilkinson H, Maes E, Vanbrabant M, Jonckheere W, Van Gelder P, Hartmann D, D'Hooge R, De Strooper B, Schymkowitz J, Rousseau F.** (2008). Lipids revert inert Abeta amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice. *EMBO J.*, 27(1):224-233.
- Matsuoka N, Yamazaki M, Yamaguchi I.** (1995). Changes in brain somatostatin in memory-deficient rats: comparison with cholinergic markers. *Neuroscience*, 66(3):617-626.
- Maulik M, Westaway D, Jhamandas JH, Kar S.** (2013). Role of cholesterol in APP metabolism and its significance in Alzheimer's disease pathogenesis. *Mol Neurobiol.*, 47(1):37-63.
- McGuinness B, Passmore P.** (2010). Can statins prevent or help treat Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis.*, 20(3):925-933.
- Métais C, Brennan K, Mably AJ, Scott M, Walsh DM, Herron CE.** (2014). Simvastatin treatment preserves synaptic plasticity in APP^{swe}/PS1^{dE9} mice. *J Alzheimers Dis.*, 39(2):315-29.
- Mizuno T, Nakata M, Naiki H, Michikawa M, Wang R, Haass C, Yanagisawa K.** (1999). Cholesterol-dependent generation of a seeding amyloid beta-protein in cell culture. *J Biol Chem.*, 274(21):15110-15114.
- Murphy MP, Morales J, Beckett TL, Astarita G, Piomelli D, Weidner A, Studzinski CM, Dowling AL, Wang X, Levine H 3rd, Kryscio RJ, Lin Y, Barrett E, Head E.** (2010). Changes in cognition and amyloid- β processing with long term cholesterol reduction using atorvastatin in aged dogs. *J Alzheimers Dis.*, 22(1):135-150.
- Naslund J, Thyberg J, Tjernberg LO, Wernstedt C, Karlström AR, Bogdanovic N, Gandy SE, Lannfelt L, Terenius L, Nordstedt C.** (1995). Characterization of stable complexes involving apolipoprotein E and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease brain. *Neuron*, 15(1):219-228.
- Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, Cuervo AM.** (2005). Extensive involvement of autophagy in

- Alzheimer's disease: An immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 64(2):113-122.
- Nixon RA.** Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J Cell Sci.*, 120(Pt 23):4081-91.
- O'Neil JN, Mouton PR, Tizabi Y, Ottinger MA, Lei DL, Ingram DK, Manaye KF.** (2007). Catecholaminergic neuronal loss in locus coeruleus of aged female dtg APP/PS1 mice. *J Chem Neuroanat.*, 34(3-4):102-107.
- Ostrowski SM, Wilkinson BL, Golde TE, Landreth G.** (2007). Statins reduce amyloid-beta production through inhibition of protein isoprenylation. *J Biol Chem.*, 282(37):26832-26844.
- Pac-Soo C, Lloyd DG, Vizcaychipi MP, Ma D.** (2011). Statins: the role in the treatment and prevention of Alzheimer's neurodegeneration. *J Alzheimers Dis.*, 27(1):1-10.
- Pappolla MA, Bryant-Thomas TK, Herbert D, Pacheco J, Fabra Garcia M, Manjon M, Girones X, Henry TL, Matsubara E, Zambon D, Wolozin B, Sano M, Cruz-Sanchez FF, Thal LJ, Petanceska SS, Refolo LM.** (2003). Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology. *Neurology*, 61(2):199-205.
- Peineau S, Taghibiglou C, Bradley C, Wong TP, Liu L, Lu J, Lo E, Wu D, Saule E, Bouschet T, Matthews P, Isaac JT, Bortolotto ZA, Wang YT, Collingridge GL.** (2007). LTP inhibits LTD in the hippocampus via regulation of GSK3beta. *Neuron.* 53(5):703-717.
- Perez SE, Dar S, Ikonovic MD, DeKosky ST, Mufson EJ.** (2007). Cholinergic forebrain degeneration in the APPswe/PS1Δ9 transgenic mouse. *Neurobiol Dis.*, 28(1):3-15.
- Perl DP.** (2010). Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med.*, 77:32-42.
- Piermartiri TC, Figueiredo CP, Rial D, Duarte FS, Bezerra SC, Mancini G, de Bem AF, Prediger RD, Tasca CI.** (2010). Atorvastatin prevents hippocampal cell death, neuroinflammation and oxidative stress following amyloid-β(1-40) administration in mice: evidence for dissociation between cognitive deficits and neuronal damage. *Exp Neurol.*, 226(2):274-284.
- Ponce J, de la Ossa NP, Hurtado O, Millan M, Arenillas JF, Davalos A, Gasull T.** (2008). Simvastatin reduces the association of NMDA receptors to lipid rafts: a cholesterol-mediated effect in neuroprotection. *Stroke*, 39:1269-1275.
- Popovic M, Caballero-Bleda M, Kadish I, Van Groen T.** (2008). Subfield and layer-specific depletion in calbindin-D28K, calretinin and parvalbumin immunoreactivity in the dentate gyrus of amyloid precursor protein/presenilin 1 transgenic mice. *Neuroscience*, 155(1):182-191.
- Posse de Chaves E.** (2012). Reciprocal regulation of cholesterol and beta amyloid at the subcellular level in Alzheimer's disease. *Can J Physiol Pharmacol.*, 90(6):753-764.
- Postina R.** (2012). Activation of α-secretase cleavage. *J Neurochem.*, 120(Suppl. 1):46-54.
- Puglielli L, Tanzi RE, Kovacs DM.** (2003). Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat Neurosci.*, 6(4):345-351.
- Ramos B, Baglietto-Vargas D, del Río JC, Moreno-González I, Santa-María C, Jiménez S, Caballero C, Lopez-Tellez JF, Khan ZU, Ruano D, Gutierrez A, Vitorica J.** (2006). Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1xAPP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 27(11):1658-1672.
- Rando RR.** (1996). Chemical biology of protein isoprenylation/methylation. *Biochim Biophys Acta*, 1300(1):5-16.
- Refolo LM, Malester B, LaFrancois J, Bryant-Thomas T, Wang R, Tint GS, Sambamurti K, Duff K, Pappolla MA.** (2000). Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis.*, 7(4):321-331.
- Reid PC, Urano Y, Kodama T, Hamakubo T.** (2007). Alzheimer's disease: cholesterol, membrane rafts, isoprenoids and statins. *J Cell Mol Med.*, 11(3):383-392.
- Ricciarelli R, Canepa E, Marengo B, Marinari UM, Poli G, Pronzato MA, Domenicotti C.** (2012). Cholesterol and Alzheimer's disease: a still poorly understood correlation. *IUBMB Life*, 64(12):931-935.
- Rockwood K.** (2006). Epidemiological and clinical trials evidence about a preventive role for statins in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand Suppl.*, 185:71-77.
- Ruan L, Kang Z, Pei G, Le Y.** (2009). Amyloid deposition and inflammation in APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.*, 6:531-540.
- Saito T, Takaki Y, Iwata N, Trojanowski J, Saido TC.** (2003). Alzheimer's disease, neuropeptides, neuropeptidase, and abeta peptide metabolism. *Sci Aging Knowledge Environ.*, 2003(3):PE1.
- Salins P, Shawesh S, He Y, Dibrov A, Kashour T, Arthur G, Amara F.** (2007). Lovastatin protects human neurons against Aβ-induced toxicity and causes activation of beta-catenin-TCF/LEF signaling. *Neurosci Lett.*, 412(3):211-216.
- Sanchez-Varo R, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, De Castro V, Jimenez S, Ruano D, Vizuete M, Davila JC, Garcia-Verdugo JM, Jimenez AJ, Vitorica J, Gutierrez A.** (2012). Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer's mice hippocampus. *Acta Neuropathol.*, 123(1):53-70.

- Sanna PP, Cammalleri M, Berton F, Simpson C, Lutjens R, Bloom FE, Francesconi W.** (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase is required for the expression but not for the induction or the maintenance of long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *J Neurosci.*, 22(9):3359-65.
- Savonenko A, Xu GM, Melnikova T, Morton JL, Gonzales V, Wong MP, Price DL, Tang F, Markowska AL, Borchelt DR.** (2005). Episodic-like memory deficits in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease: relationships to beta-amyloid deposition and neurotransmitter abnormalities. *Neurobiol Dis.*, 18:602-617.
- Schettini G.** (1991). Brain somatostatin: receptor-coupled transducing mechanisms and role in cognitive functions. *Pharmacol Res.*, 23(3):203-215.
- Schneider A, Schulz-Schaeffer W, Hartmann T, Schulz JB, Simons M.** (2006). Cholesterol depletion reduces aggregation of amyloid-beta peptide in hippocampal neurons. *Neurobiol Dis.*, 23(3):573-577.
- Shepardson NE, Shankar GM, Selkoe DJ.** (2011). Cholesterol level and statin use in Alzheimer disease: I. Review of epidemiological and preclinical studies. *Arch Neurol.*, 68(10):1239-44.
- Shinohara M, Sato N, Kurinami H, Takeuchi D, Takeda S, Shimamura M, Yamashita T, Uchiyama Y, Rakugi H, Morishita R.** (2010). Reduction of brain beta-amyloid (A β) by fluvastatin, a hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor, through increase in degradation of amyloid precursor protein C-terminal fragments (APP-CTFs) and A β clearance. *J Biol Chem.*, 285(29):22091-22102.
- Shishehbor MH, Brennan ML, Aviles RJ, Fu X, Penn MS, Sprecher DL, Hazen SL.** (2003). Statins promote potent systemic antioxidant effects through specific inflammatory pathways. *Circulation*, 108(4):426-431.
- Silva T, Teixeira J, Remião F, Borges F.** (2013). Alzheimer's disease, cholesterol, and statins: the junctions of important metabolic pathways. *Angew Chem Int Ed Engl.*, 52(4):1110-1121.
- Simons M, Keller P, De Strooper B, Beyreuther K, Dotti CG, Simons K.** (1998). Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *PNAS*, 95(11):6460-6464.
- Sjögren M, Gustafsson K, Syversen S, Olsson A, Edman A, Davidsson P, Wallin A, Blennow K.** (2003). Treatment with simvastatin in patients with Alzheimer's disease lowers both alpha- and beta-cleaved amyloid precursor protein. *Dement Geriatr Cogn Disord.*, 16(1):25-30.
- Sparks DL, Hunsaker JC 3rd, Scheff SW, Kryscio RJ, Henson JL, Markesbery WR.** (1990). Cortical senile plaques in coronary artery disease, aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 11(6):601-607.
- Sparks DL, Scheff SW, Hunsaker JC 3rd, Liu H, Landers T, Gross DR.** (1994). Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. *Exp Neurol.*, 126(1):88-94.
- Sparks DL, Petanceska S, Sabbagh M, Connor D, Soares H, Adler C, Lopez J, Ziolkowski C, Lochhead J, Browne P.** (2005). Cholesterol, copper and A β in controls, MCI, AD and the AD cholesterol-lowering treatment trial (ADCLT). *Curr Alzheimer Res.*, 2(5):527-539.
- Sparks DL, Connor DJ, Sabbagh MN, Petersen RB, Lopez J, Browne P.** (2006). Circulating cholesterol levels, apolipoprotein E genotype and dementia severity influence the benefit of atorvastatin treatment in Alzheimer's disease: results of the Alzheimer's Disease Cholesterol-Lowering Treatment (ADCLT) trial. *Acta Neurol Scand Suppl.*, 185:3-7.
- Sparks DL.** (2011). Alzheimer disease statins in the treatment of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.*, 7:662-663.
- Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong LM, Salvesen GS, Pericak-Vance M, Schmechel D, Saunders AM, Goldgaber D, Roses AD.** (1993). Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(17):8098-8102.
- Su JH, Cummings BJ, Cotman CW.** (1998). Plaque biogenesis in brain aging and Alzheimer's disease. II. Progressive transformation and developmental sequence of dystrophic neurites. *Acta Neuropathol.*, 96(5):463-471.
- Sun J, Xie C, Liu W, Lu D, Qiao W, Huang Q, Huo Z, Shen H, Lin Z.** (2012). The effects of simvastatin on hippocampal caspase-3 and Bcl-2 expression following kainate-induced seizures in rats. *Int J Mol Med.*, 30(4):739-746.
- Takahashi H, Brasnjevic I, Rutten BPF, Van Der Kolk N, Perl DP, Bouras C, Steinbusch HWM, Schmitz C, Hof PR, Dickstein DL.** (2010). Hippocampal interneuron loss in an APP/PS1 double mutant mouse and in Alzheimer's disease. *Brain Struct Funct.*, 214:145-160.
- Tamboli IY, Barth E, Christian L, Siepmann M, Kumar S, Singh S, Tolksdorf K, Heneka MT, Lütjohann D, Wunderlich P, Walter J.** (2010). Statins promote the degradation of extracellular amyloid {beta}-peptide by microglia via stimulation of exosome-associated insulin-degrading enzyme (IDE) secretion. *J Biol Chem.*, 285(48):37405-37414.
- Tamboli IY, Hampel H, Tien NT, Tolksdorf K, Breiden B, Mathews PM, Saftig P, Sandhoff K, Walter J.** (2011). Sphingolipid storage affects autophagic metabolism of the amyloid precursor protein and promotes A β generation. *J Neurosci.*, 31(5):1837-1849.

- Tanaka K, Honda M, Takabatake T.** (2004). Anti-apoptotic effect of atorvastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor, on cardiac myocytes through protein kinase C activation. *ClinExpPharmacol Physiol.*, 31(5-6):360-4.
- Tong XK, Nicolakakis N, Fernandes P, Ongali B, Brouillette J, Quirion R, Hamel E.** (2009). Simvastatin improves cerebrovascular function and counters soluble amyloid-beta, inflammation and oxidative stress in aged APP mice. *Neurobiol Dis.*, 35(3):406-414.
- Tong XK, Lecrux C, Hamel E.** (2012). Age-dependent rescue by simvastatin of Alzheimer's disease cerebrovascular and memory deficits. *Neurobiol Dis.*, 32(14):4705-4715.
- Torres M, Jimenez S, Sanchez-Varo R, Navarro V, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Carmona I, Davila JC, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J.** (2012). Defective lysosomal proteolysis and axonal transport are early pathogenic events that worsen with age leading to increased APP metabolism and synaptic Abeta in transgenic APP/PS1 hippocampus. *Mol Neurodegener.*, 7:59.
- Torres M, Price SL, Fiol-Deroque MA, Marcilla-Etxenike A, Ahyayauch H, Barceló-Coblijn G, Terés S, Katsouri L, Ordinas M, López DJ, Ibarguren M, Goñi FM, Busquets X, Vitorica J, Sastre M, Escribá PV.** (2014). Membrane lipid modifications and therapeutic effects mediated by hydroxydocosaheptaenoic acid on Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, 1838(6):1680-1692.
- Trujillo-Estrada L, Jimenez S, De Castro V, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Navarro V, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Davila JC, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J.** (2013). In vivo modification of Abeta plaque toxicity as a novel neuroprotective lithium-mediated therapy for Alzheimer's disease pathology. *Acta Neuropathol Commun.*, 1(1):73.
- Van de Nes JA, Sabdmann-Keil D, Braak H.** (2002). Interstitial cells subjacent to the entorhinal region expressing somatostatin-28 immunoreactivity are susceptible to development of Alzheimer's disease-related cytoskeletal changes. *Acta Neuropathol.*, 104(4):351-356.
- van der Most PJ, Dolga AM, Nijholt IM, Luiten PG, Eisel UL.** (2009). Statins: mechanisms of neuroprotection. *Prog Neurobiol.*, 88(1):64-75.
- Vécsei L.** (1993). Alzheimer's disease and somatostatin: a therapeutic hypothesis. *Biol Psychiatry*, 34(10):673-675.
- Vécsei L, Klivenyi P.** (1995). Somatostatin and Alzheimer's disease. *ArchGerontolGeriatr.*, 21(1):35-41.
- Vela J, Gutierrez A, Vitorica J, Ruano D.** (2003). Rat hippocampal GABAergic molecular markers are differentially affected by ageing. *J Neurosci.*, 85(2):368-377.
- Vergheze PB, Castellano JM, Holtzman DM.** (2011). Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Lancet Neurol.*, 10(3):241-252.
- Vetrivel KS, Cheng H, Lin W, Sakurai T, Li T, Nukina N, Wong PC, Xu H, Thinakaran G.** (2004). Association of gamma-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes. *J Biol Chem.*, 279(43):44945-44954.
- Vetrivel KS, Thinakaran G.** (2010). Membrane rafts in Alzheimer's disease beta-amyloid production. *Biochim Biophys Acta*, 1801(8):860-867.
- Wahrle S, Das P, Nyborg AC, McLendon C, Shoji M, Kawarabayashi T, Younkin LH, Younkin SG, Golde TE.** (2002). Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiol Dis.*, 9(1):11-23.
- Wood WG, Li L, Müller W, Eckert GP.** (2014). Cholesterol as a causative factor in Alzheimer's disease: a debatable hypothesis. *J Neurochem.*, 129:559-572.
- Woodhouse A, Vickers JC, Adlard PA, Dickson TC.** (2009). Dystrophic neurites in TgCRND8 and Tg2576 mice mimic human pathological brain aging. *Neurobiol Aging*, 30(6):864-874.
- Xiong H, Callaghan D, Wodzinska J, Xu J, Premyslova M, Liu QY, Connelly J, Zhang W.** (2011). Biochemical and behavioral characterization of the double transgenic mouse model (APP^{swe}/PS1^{dE9}) of Alzheimer's disease. *Neurosci Bull.*, 27(4):221-232.
- Zacco A, Togo J, Spence K, Ellis A, Lloyd D, Furlong S, Piser T.** (2003). 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect cortical neurons from excitotoxicity. *J Neurosci.*, 23(35):11104-11111.
- Zhang W, Bai M, Xi Y, Hao J, Liu L, Mao N, Su C, Miao J, Li Z.** (2012). Early memory deficits precede plaque deposition in APP^{swe}/PS1^{dE9} mice: involvement of oxidative stress and cholinergic dysfunction. *Free Radic Biol Med.*, 52:1443-1452.
- Zhou Y, Suram A, Venugopal C, Prakasam A, Lin S, Su Y, Li B, Paul SM, Sambamurti K.** (2008). Geranylgeranyl pyrophosphate stimulates gamma-secretase to increase the generation of Abeta and APP-CTF γ . *FASEB J.*, 22(1)

3.5.

Efecto de la delección de IL-4 sobre la progresión de la patología en un modelo transgénico de Alzheimer

INTRODUCCIÓN

Datos preclínicos, epidemiológicos y genéticos han mostrado la implicación del sistema inmune en la enfermedad de Alzheimer, siendo la respuesta neuroinflamatoria una de las lesiones histopatológicas de la enfermedad (Zhang y col., 2013; Heppner y col., 2015; ver Apdo. 1.1.6 de la Introducción). A esta relación contribuyó la identificación de la asociación entre la EA y mutaciones en genes relacionados con el sistema inmune, como *TREM2* (Guerreiro y col., 2013; Jonsson y col., 2013) y el antígeno CD33 (Bradshaw y col., 2013). Además, se han encontrado niveles elevados de citoquinas, como las interleuquinas IL-1, IL-6, IL-12, IL-23 y el factor de necrosis tumoral (TNF), en tejido y fluidos cerebrales de individuos con Alzheimer (Akiyama y col., 2000; Kitazawa y col., 2004; Fagan y Perrin, 2012; Brosseron y col., 2014) y en modelos transgénicos de la enfermedad (ver revisión Heppner y col., 2015).

La activación de la inmunidad innata es un factor clave en la enfermedad de Alzheimer (Heneka y col., 2014; 2015). Los elementos celulares más importantes del sistema inmune innato cerebral implicados en este proceso son las células de la microglia y de la astrogliá. La microglía son células mieloides residentes en el SNC que participan en la lucha contra los patógenos y en la homeostasis y plasticidad del SNC (Prinz y Priller, 2014). En este sentido, se ha visto que el A β puede ser eliminado por la microglía *in vitro* a

través de su fagocitosis (Prokop y col., 2013) y que la microglía produce enzimas, como la neprelisina y la enzima degradadora de insulina, para la degradación del A β (Lee y Landreth, 2010). Así, la vacuna contra péptidos de A β conduce a la activación microglial y el descenso en la carga amiloide (Wilcock y col., 2003; 2004a,b). Por otro lado, la microglía también podría estar involucrada en la formación de las placas de A β , facilitando la agregación de oligómeros solubles en formas fibrilares menos tóxicas (Nagele y col., 2004). Además, se ha propuesto un papel trófico y regenerativo para la respuesta inflamatoria, ya que las células gliales activadas pueden secretar citoquinas antiinflamatorias (Butovsky y col., 2006) y factores neuroprotectores (Streit, 2005; Heppner y col., 2015).

No obstante, las pruebas también sugieren que la microglía puede mostrar un fenotipo disfuncional en la EA (Orre y col., 2014; Streit y col., 2014), con una reducción en la fagocitosis y un incremento en la secreción de mediadores inflamatorios que dañan la integridad neuronal (Michaud y Rivest, 2015). Por ello, el proceso neurodegenerativo de la EA podría ser exacerbado por una respuesta inflamatoria crónica al A β (Kitazawa y col., 2004; Wyss-Coray, 2006; Heneka y O'Banion, 2007), ya que tras la deposición del péptido se produce una respuesta inflamatoria caracterizada por microglía activa y astrocitos reactivos, que pueden mediar el daño neuronal (Sastre y col., 2006) al producir citoquinas inflamatorias, aminoácidos excitadores y especies reactivas de oxígeno (Craft y col., 2006; Zipp y Aktas, 2006). De hecho, se ha correlacionado la microgliosis con el déficit cognitivo en la EA (Edison y col., 2008; Yokokura y col., 2011).

La microglía y los macrófagos en general, presentan dos estadios de activación con funciones diferentes y caracterizados por la expresión de moléculas diferentes (para detalle ver Apdo. 1.1.6.1 de la Introducción). La activación clásica M1 es inducida por moléculas como IFN- γ , TNF- α e IL-1 β derivadas de células Th1. Los macrófagos M1 producen citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-2, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y enzimas proteolíticos que pueden conducir al deterioro de la matriz extracelular, degradando la integridad celular. La activación alternativa da lugar a macrófagos M2 y conduce a la expresión de genes para la resolución de la inflamación. Estos macrófagos liberan citoquinas antiinflamatorias como IL-4, IL-10 y TGF- β . Los macrófagos M2 se dividen en M2a, M2b y M2c (ver revisiones Luzina y col., 2012; Varnum e Ikezu, 2012; Latta y col., 2014).

Nuestro grupo de investigación ha descrito, previamente, un cambio fenotípico dependiente de la edad en la activación microglial en el hipocampo del modelo transgénico PS1/APP, desde un estado de activación alternativo (con capacidad de fagocitar A β) en fases iniciales de la patología amiloide, a un estado clásico citotóxico, en estadios avanzados de la enfermedad (Jimenez y col., 2008). Por tanto, una modulación de la

respuesta inmune innata hacia un fenotipo alternativo podría ser considerada como una estrategia terapéutica potencial para el tratamiento de la EA.

Las citoquinas antiinflamatorias, como la interleuquina-4 (IL-4), conducen a la supresión de la respuesta proinflamatoria (Brown y Hural, 1997; Luzina y col., 2012; Cherry y col., 2014). Esta citoquina, producida por mastocitos, basófilos, eosinófilos y células T, induce el fenotipo de activación M2a en los macrófagos, conduciendo a una respuesta Th2 clásica. De hecho, en nuestro modelo PS1/APP identificamos la expresión de IL-4 en astrocitos reactivos y en linfocitos CD3-positivos infiltrados en el parénquima hipocampal en animales de 18 meses de edad (Jimenez y col., 2008). El estado de polarización Th2 (antiinflamatorio) de estos linfocitos podría contrarrestar la respuesta neurotóxica de la microglía activada y explicar así la escasa muerte neuronal en los modelos. Muchos estudios *in vitro* han probado la influencia de IL-4 en el desarrollo de fenotipos alternativos no proinflamatorios (Butovsky y col., 2005; Iribarren y col., 2005; Lyons y col., 2007; Ponomarev y col., 2007). Estos macrófagos alternativos se encargan de la resolución de la inflamación y la fagocitosis.

Así, de acuerdo a su papel fisiológico, la microglía alternativa podría ejercer una función neuroprotectora. En este sentido, en presencia de IL-4, la microglía produce factores de crecimiento como IGF-1 (factor de crecimiento insulínico de tipo 1, del inglés *insulin-like growth factor-1*) (Butovsky y col., 2005; 2006; Zhao y col., 2006) y reduce la producción de citoquinas inflamatorias como TNF- α (Hart y col., 1989). Además, en la EA esta citoquina estimula a la microglía para la fagocitosis del A β (Koenigsknecht-Talboo y Landreth, 2005; Shimizu y col., 2008; Yamamoto y col., 2008) y reduce su toxicidad *in vitro* e *in vivo* (Butovsky y col., 2005; Iribarren y col., 2005; Lyons y col., 2007). Sin embargo, estudios *in vivo* han mostrado que la capacidad fagocítica de estas células está alterada con la progresión de la EA (Koenigsknecht-Talboo y Landreth, 2005).

Además de su implicación en la respuesta inmune, IL-4 juega un papel crítico en las funciones superiores del cerebro como la memoria y el aprendizaje (Gadani y col., 2012). Así, la disminución de la expresión de receptores de IL-4 en el hipocampo durante el envejecimiento, contribuye al daño cognitivo (Nolan y col., 2005), al causar déficits en la LTP (Maher y col., 2005) y se ha visto que el tratamiento con IL-4 restaura la actividad sináptica en ratas y atenúa los déficits en la LTP inducidos por la infusión intracerebroventricular de A β (Lyons y col., 2007). El efecto sobre la cognición se ha mostrado en ratones *knockout* para esta interleuquina en los que se observaron déficits severos en el aprendizaje (Derecki y col., 2010).

Por tanto, desde la pasada década, el proceso inflamatorio ha sido foco de interés en el campo de la EA, no sólo por su papel en la degeneración neuronal sino también como diana terapéutica. Sin embargo, aunque se conoce ampliamente la implicación de la respuesta inmune en esta enfermedad, todavía se desconoce cómo afecta el fenotipo de

activación al comienzo o progresión de la misma, lo que podría explicar el fallo de terapias antiinflamatorias (Sastre y Gentleman, 2010; Latta y col., 2014). Modular la respuesta inflamatoria usando modelos animales de la EA ofrece la posibilidad de investigar el papel de los componentes inflamatorios individualmente y su implicación en el desarrollo de la enfermedad (ver revisión Birch y col., 2014). En general, se espera que la sobreexpresión de mediadores proinflamatorios exacerbe la enfermedad y viceversa, habiéndose propuesto que las estrategias antiinflamatorias tienen efectos beneficiosos en la EA incrementando la eliminación del péptido amiloide (Kiyota y col., 2010).

Por todo lo anteriormente expuesto, hemos decidido investigar el efecto de la supresión de la expresión de IL-4 en un modelo transgénico de EA. Para ello, hemos generado un nuevo modelo a partir del cruce de animales transgénicos APP con animales *knockout* para esta citoquina, animales APP/IL4^{-/-} (ver Apdo. 2.1.3 de Material y métodos), que posteriormente hemos caracterizado con técnicas celulares y moleculares.

RESULTADOS

3.5.1. La delección del gen que codifica para la interleuquina-4 (IL-4) exacerba la patología amiloide en el modelo APP

Para determinar el papel de la IL-4 en la EA, cruzamos animales transgénicos APP_{SWE/LOND} (en adelante APP) con un ratón *knockout* para IL-4, obteniéndose animales APP/IL4^{-/-}. La elección del modelo APP, en lugar de un modelo bigénico PS1/APP, viene motivado por la alta mortalidad de los animales PS1/APP al cruzarlos con el KO IL4^{-/-} tal y como se explica en material y métodos (pág. 67). El modelo APP_{SWE/LOND} sobreexpresa el APP humano en su isoforma 751 con la mutación *London* (V7117I) y la doble mutación *Swedish* (K670M/N671L), bajo la regulación del promotor murino Thy-1. La generación de los animales APP/IL4^{-/-} se describe en el Apdo. 2.1.3 de material y métodos. Estos animales nacieron siguiendo ratios mendelianas y no mostraron defectos anatómicos o muerte prematura.

El modelo APP_{SWE/LOND} se caracteriza por desarrollar placas amiloides a partir de los 3-4 meses de edad, apareciendo los primeros depósitos en el hipocampo a los 5-7 meses (Rockenstein y col., 2001). Por lo tanto, el primer paso consistió en determinar el papel de la citoquina antiinflamatoria IL-4 en la regulación de la acumulación de péptidos Aβ en el cerebro, ya que la inflamación puede potenciar la patología de la EA al incrementar la generación de Aβ, o afectar a su agregación o a su eliminación.

El análisis inmunohistoquímico con un anticuerpo para el péptido Aβ₄₂, en secciones de hipocampo de animales APP y APP/IL4^{-/-} de 6, 9, 12 y 18 meses de edad, mostró un incremento en el número de placas en los animales APP/IL4^{-/-} con respecto a los APP a partir de los 9 meses de edad (Fig. 3.5.1). Este aumento, a los 9 meses, en la

inmunotinción con A β fue muy patente en la región del giro dentado, en concreto en una delgada banda sobre la capa de células granulares (Fig. 3.5.1A2 y B2) que corresponde con el campo terminal de las aferencias de la vía perforante. En CA1 también fue evidente el incremento en la deposición de placas A β 42 en los animales APP/IL4^{-/-} (Fig. 3.5.1A2-B2), aumento que fue aún más patente a los 12 meses de edad (Fig. 3.5.1A3-B3).

En la Fig. 3.5.2 se observan detalles de CA1 y el giro dentado a los 9 y 12 meses de edad con la inmunotinción para Abeta42. Se corrobora el aumento en el número de placas en los animales APP/IL4^{-/-} con respecto a los APP a ambas edades, tanto en CA1 (Fig. 3.5.2A-B) como en el GD (Fig. 3.5.2C-D).

La cuantificación de la carga amiloide del hipocampo (Fig. 3.5.3), utilizando como marcador el A β 42, confirmó lo observado en las imágenes anteriores. Tanto en CA1 (Fig. 3.5.3A) como en el GD (Fig. 3.5.3B) se produjo un incremento significativo en la carga de A β 42 en los animales APP/IL4^{-/-} con respecto a los APP a partir de los 9 meses de edad (incremento APP/IL4^{-/-} vs. APP en CA1: para 9 meses, 23,72 \pm 15,93%; 12 meses, 18,75 \pm 16,88%; 18 meses, 37,26 \pm 3,71%. Incremento en GD: 9 meses, 15,20 \pm 37,66%; 12 meses, 23,39 \pm 25,76%; 18 meses, 18,58 \pm 13,20%. n=6 animales/grupo, 5 secciones/animal; ADEVA de 1 vía, *post-hoc* de Tukey, ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05). Además y como era de esperar, tanto en los animales APP como en los APP/IL4^{-/-} se observó un aumento significativo en la carga amiloide con la edad.

Para determinar si el incremento en la carga amiloide se debía a un aumento en el número de placas o a un mayor tamaño de las mismas, se procedió, en primer lugar a la cuantificación estereológica de la densidad numérica de las placas de A β 42 (placas/mm³) de CA1 (Fig. 3.5.3C). Aquí, se obtuvo un incremento significativo en el número de placas por unidad de volumen en los animales APP/IL4^{-/-} con respecto a los APP a los 9, 12 y 18 meses de edad, así como un aumento con la edad para cada uno de los grupos de animales de estudio (n=6 animales/grupo, 5 secciones/animal; ADEVA de 1 vía, *post-hoc* de Tukey, ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05).

Para el análisis morfométrico de las placas de A β 42 (Fig. 3.5.4), éstas se clasificaron en cuatro rangos de tamaño (<200, 200-500, 500-1000 y >1000 μ m²). Sorprendentemente, como se observa en el diagrama de barras apilado (Fig. 3.5.4A), no se observaron diferencias significativas (n=6 animales/grupo, 5 secciones/animal; ADEVA de 1 vía, *post-hoc* de Tukey, p>0,05) en el tamaño de las placas entre ambos genotipos salvo para el rango de placas de menor tamaño (<200 μ m²) a los 12 meses de edad. La distribución de las placas/mm² (Fig. 3.5.4B) mostró que, para todos los rangos de tamaño analizados, el número de placas aumenta con la edad del animal, independientemente del genotipo. Asimismo, se observaron diferencias significativas dentro del mismo grupo entre los diferentes rangos de tamaño, de manera que tanto para los animales APP como para los APP/IL4^{-/-}, a medida que el animal envejece, aumenta el tamaño de las placas (así, por

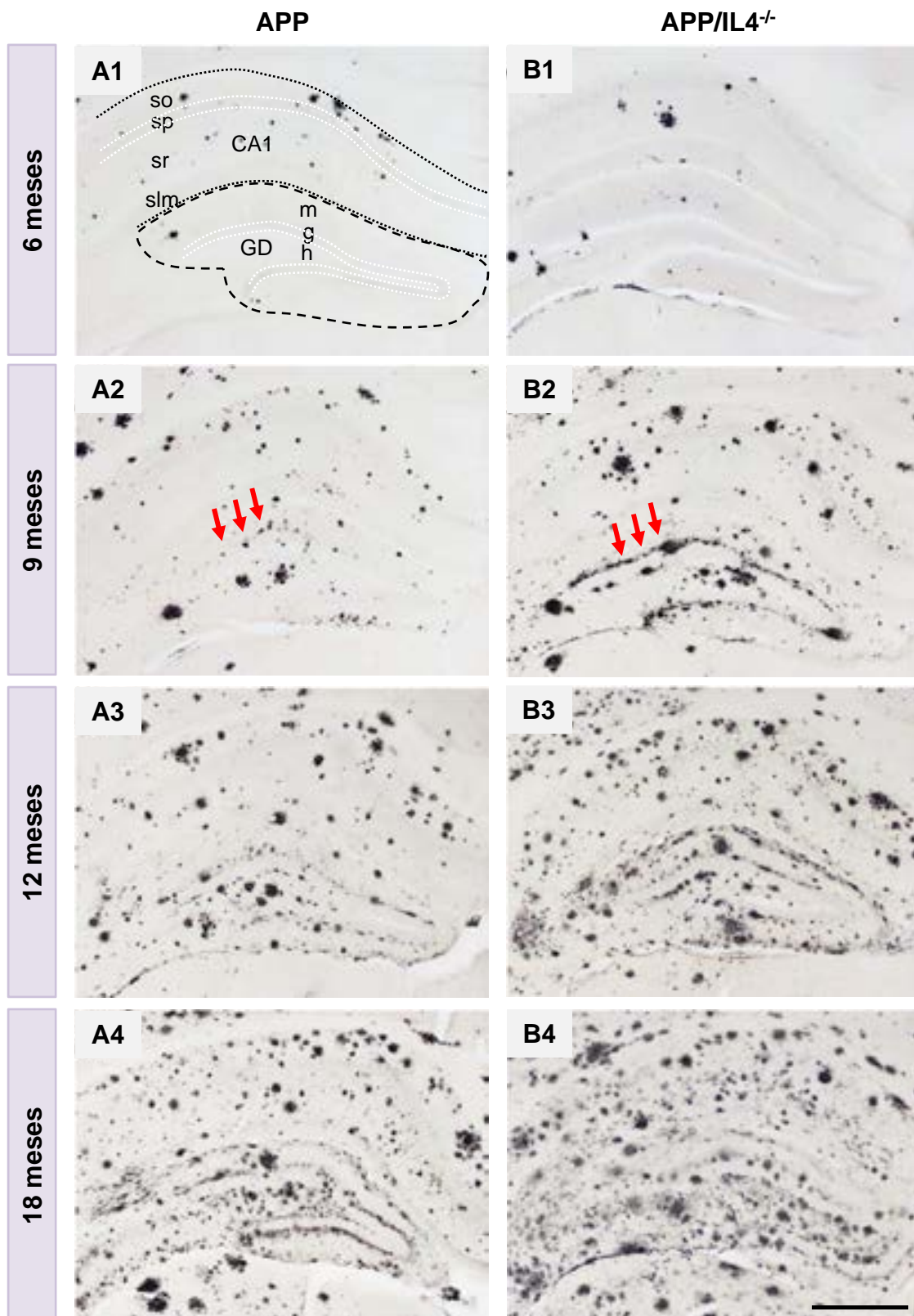


Figura 3.5.1. Aumento de la patología amiloide en el hipocampo de los animales APP/IL4^{-/-}. Imágenes de microscopía de campo claro representativas de la inmunotinción para Abeta42 en el hipocampo de animales APP (A) y APP/IL4^{-/-} (B) a los 6, 9, 12 y 18 meses de edad. Se observa un incremento en la cantidad de pacas amiloides en los animales APP/IL4^{-/-} con respecto a los APP a partir de los 9 meses de edad, especialmente patente sobre la capa granular del giro dentado (flechas rojas), y un incremento relacionado con la edad en ambos genotipos. Barras de escala: A-B, 500 μ m. GD: giro dentado; so: *stratum oriens*; sp: *stratum pyramidale*; sr: *stratum radiatum*; slm: *stratum lacunosum-moleculare*; m: capa molecular; g: capa granular; h: hilio.

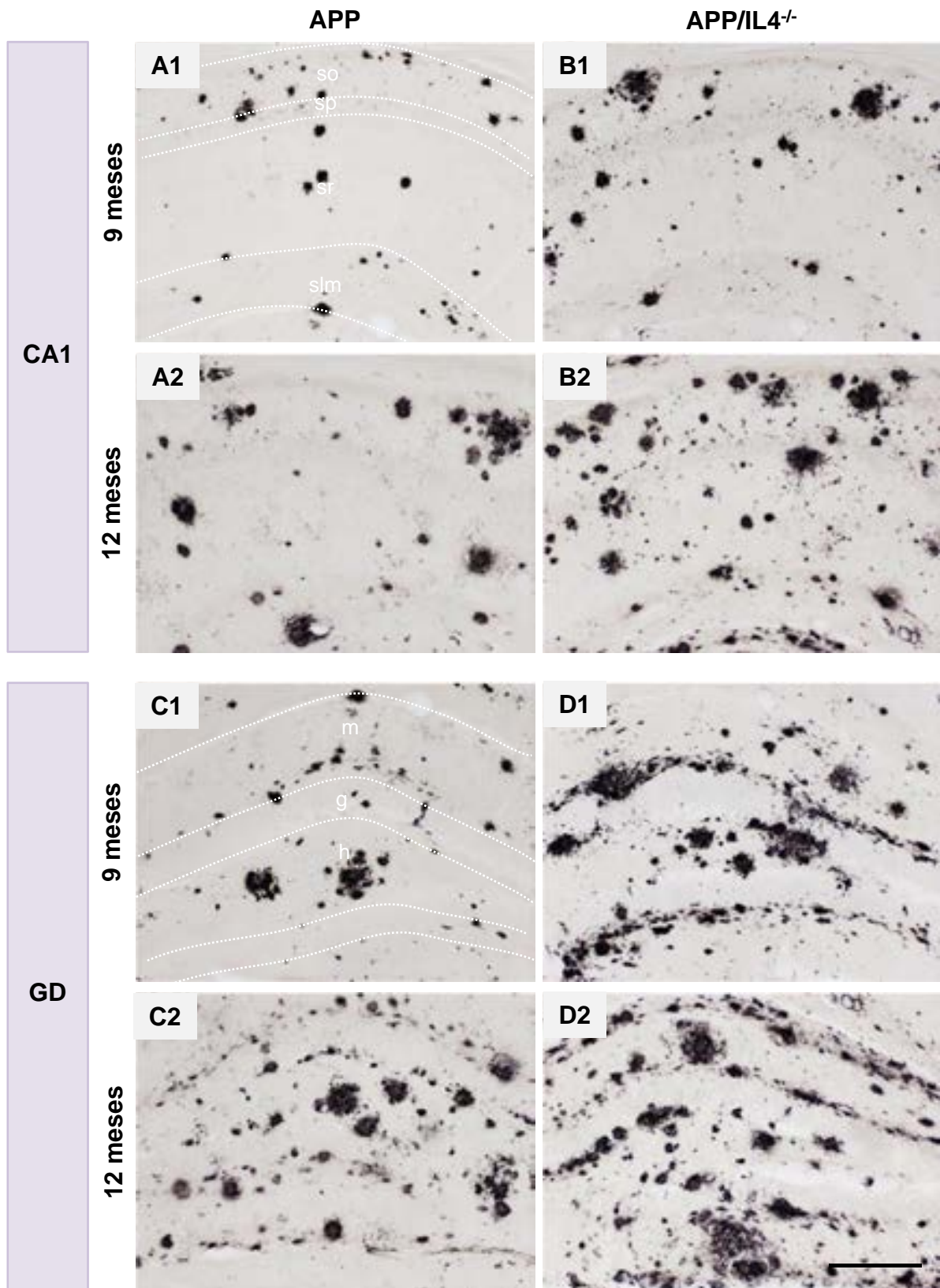


Figura 3.5.2. Patología amiloide en la región de CA1 y el giro dentado de los animales APP y APP/IL4^{-/-}. La cantidad de placas de Aβ42 es mayor en los animales APP/IL4^{-/-} (B-D) que en los APP (A-C) tanto en la región CA1 del hipocampo (A-B) como en el giro dentado (C-D) a los 9 y 12 meses de edad. Barra de escala: 200 μm. GD: giro dentado; so: *stratum oriens*; sp: *stratum pyramidale*; sr: *stratum radiatum*; slm: *stratum lacunosum-moleculare*; m: capa molecular; g: capa granular; h: hilio.

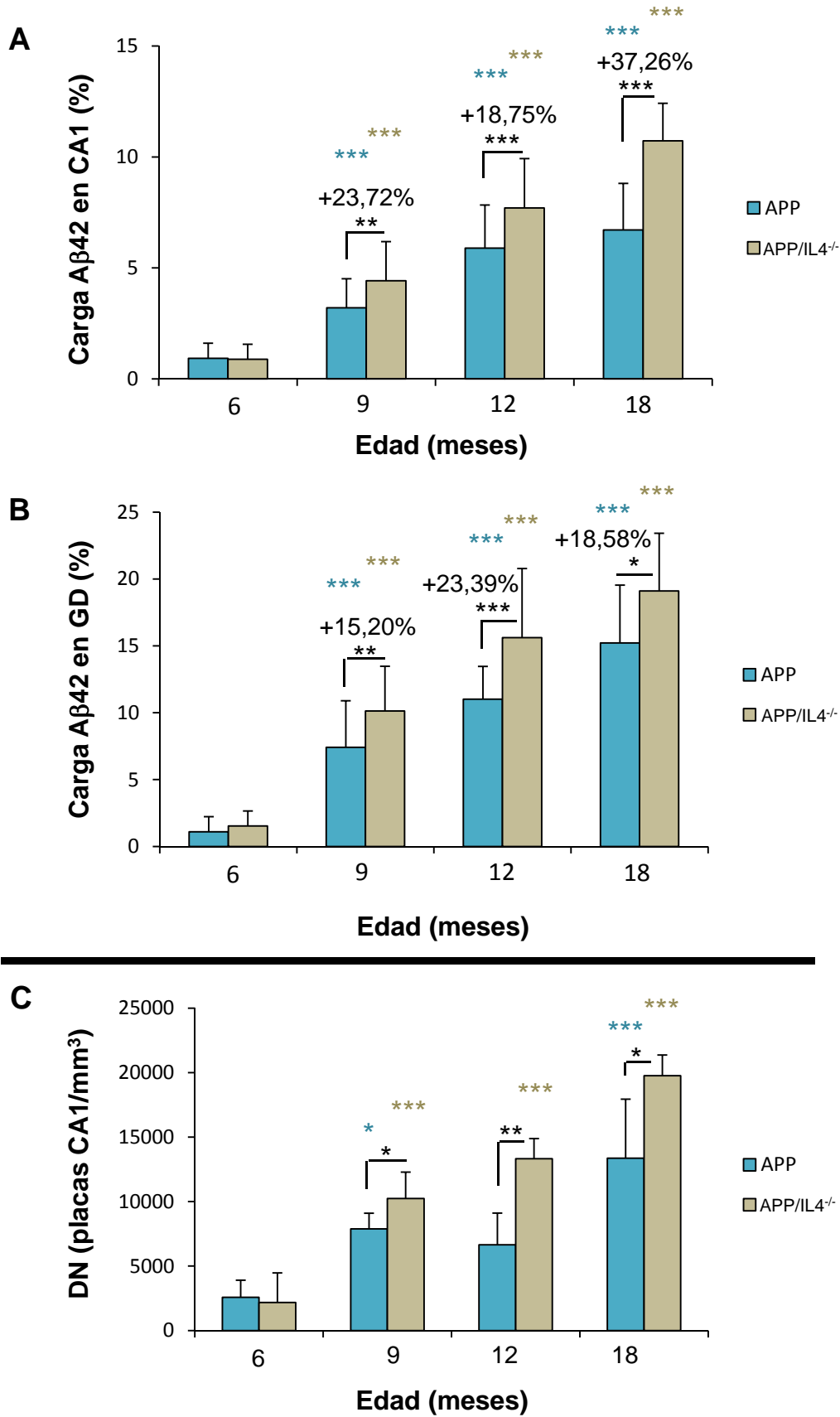


Figura 3.5.3. La deficiencia de IL-4 induce un aumento significativo de la carga amiloide.

Figura 3.5.3. La deficiencia de IL-4 induce un aumento significativo de la carga amiloide. El análisis cuantitativo de la carga amiloide (% de área de la región ocupada por los depósitos de A β) mostró por un lado, un incremento con la edad para ambos genotipos (significancia señalada con asteriscos azules para los animales APP y marrones para los APP/IL4^{-/-}), y por otro, confirmó el incremento en la carga de A β 42 en los APP/IL4^{-/-} comparado con los animales APP, tanto en el área CA1 (A) como en el GD (B) (significancia señalada con asteriscos negros). C) El análisis de la densidad numérica (DN) de placas en CA1 (placas/mm³) mostró un incremento significativo con la edad tanto en los animales APP como en los APP/IL4^{-/-} (significancia señalada con asteriscos azul para APP y marrón para APP/IL4^{-/-}). Además, se observaron diferencias significativas en el DN entre los animales APP y APP/IL4^{-/-} a partir de los 9 meses de edad, siendo ésta mayor en los animales APP/IL4^{-/-} (significancia señalada con asteriscos negros). Los datos representan la media \pm SD y fueron analizados mediante un ADEVA de 1 vía (CA1 F(7,208)=121,7, p<0,0001; GD F(7,210)=102,6, p<0,0001; DN F(7,21)=29,24, p<0,0001), seguido de un *post-hoc* de Tukey, ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05. n=6 por grupo, 5 secciones por animal.

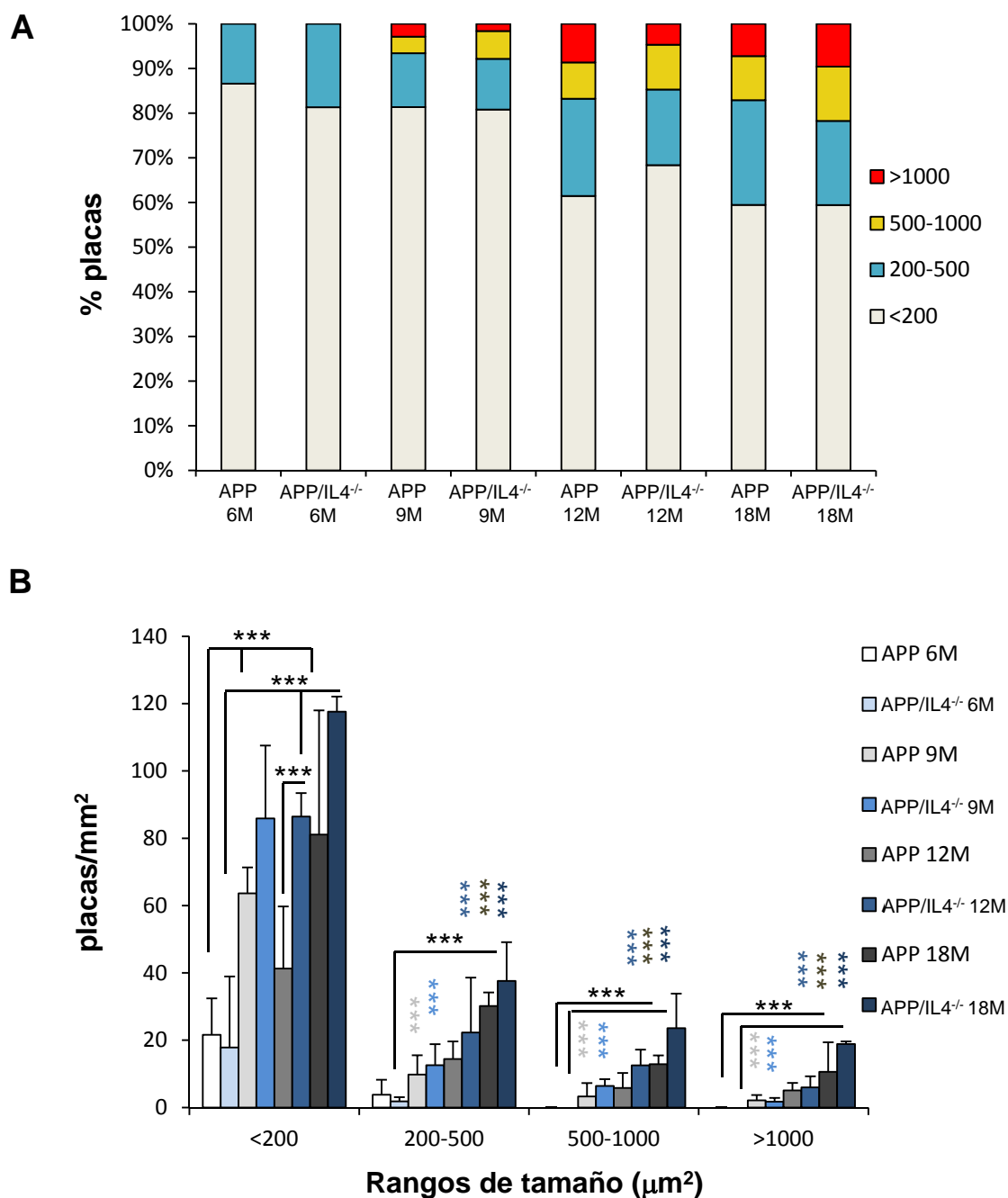


Figura 3.5.4. Estudio comparativo del tamaño y densidad de las placas amiloides durante la progresión de la patología en CA1. Las placas se clasificaron en 4 rangos de tamaño (<200, 200-500, 500-1000 y >1000 μm²). El análisis cuantitativo del tamaño de placas mostró un incremento en el tamaño de placas con la edad para ambos genotipos (a mayor edad, los depósitos eran de mayor tamaño), como se puede observar en el diagrama de barras apilado (A). Por otro lado, reveló que no existían diferencias en el % de placas de cada tamaño entre los animales APP y APP/IL4^{-/-} para la misma edad, es decir, que el tamaño de las placas evolucionaba de la misma forma para ambos genotipos. El número de placas/mm² (B) mostró que en ambos grupos (APP y APP/IL4^{-/-}) se produce un incremento en el número de placas con la edad y en el tamaño de las mismas. Los datos representan la media±SD y fueron analizados por un ADEVA de 1 vía ($F_A(31,80)=34,75$, $p<0,0001$, $F_B(31,80)=31,09$, $p<0,0001$) seguido de un *post-hoc* Tukey, *** $p<0,001$. n=6 por grupo, 5 secciones por animal.

ejemplo, las placas del rango mayor de tamaño solo están presentes en los animales de edad avanzada). El número de placas de menor rango ($<200 \mu\text{m}^2$) fue significativamente mayor que el resto de rangos de tamaño para todas las edades y genotipos (significancia en color, cada color corresponde con su genotipo y edad). La única diferencia significativa observada entre los genotipos para una misma edad, fue el número de placas de menor tamaño a los 12 meses de edad que es significativamente mayor en los animales APP/IL4^{-/-} (n=6 animales/grupo, 5 secciones/animal; ADEVA de 1 vía, *post-hoc* de Tukey, ***p<0,001).

El incremento en la carga amiloide descrito en la Fig.3.5.3 en los animales APP/IL4^{-/-} con respecto a los APP, se corroboró mediante análisis de los niveles de A β por *Western-blot* (Fig. 3.5.5), obteniéndose diferencias significativas desde los 6 meses de edad (n=6 animales/grupo; ADEVA de 1 vía, *post-hoc* de Tukey, *p<0,05).

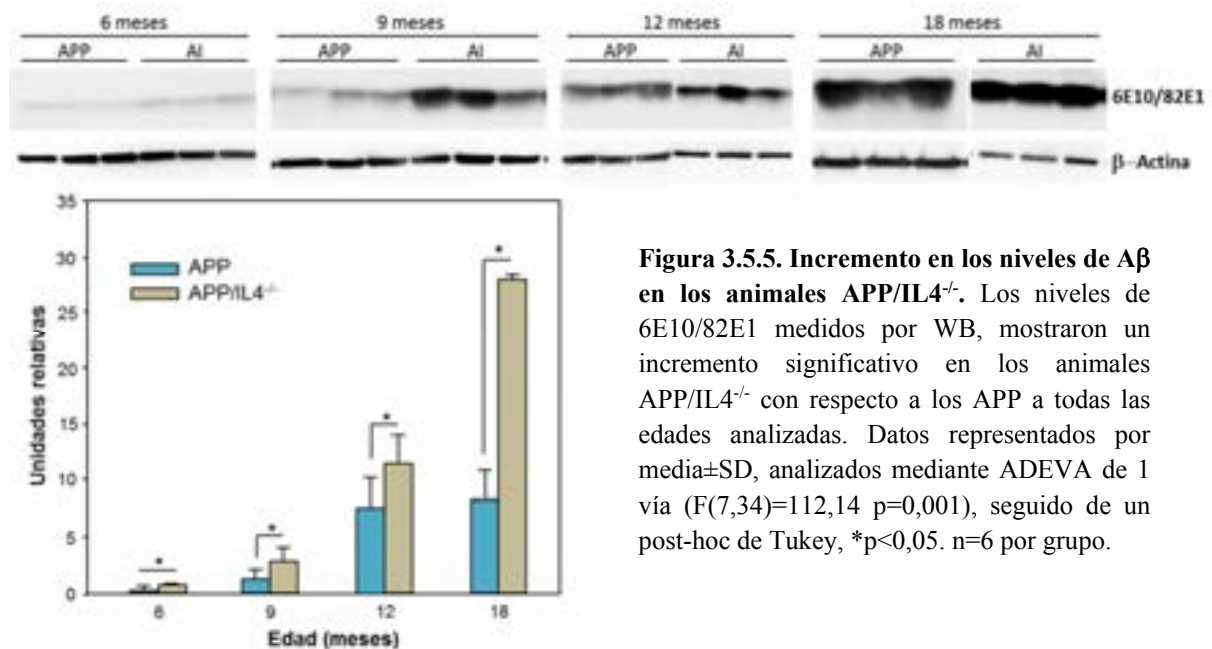


Figura 3.5.5. Incremento en los niveles de A β en los animales APP/IL4^{-/-}. Los niveles de 6E10/82E1 medidos por WB, mostraron un incremento significativo en los animales APP/IL4^{-/-} con respecto a los APP a todas las edades analizadas. Datos representados por media \pm SD, analizados mediante ADEVA de 1 vía (F(7,34)=112,14 p=0,001), seguido de un *post-hoc* de Tukey, *p<0,05. n=6 por grupo.

3.5.2. Respuesta inflamatoria en los animales APP/IL4^{-/-}

Otra de las características histopatológicas de la EA es la presencia de microglía y astrogliá activada alrededor de las placas seniles, siendo la inflamación un componente crítico de la patogénesis de la enfermedad. Los animales transgénicos APP muestran una respuesta inflamatoria caracterizada por la activación glial a partir de los 6 meses de edad y que evoluciona de manera similar a la deposición amiloide (Löffler y col., 2014).

Para analizar el efecto de la deficiencia de IL-4 en la respuesta neuroinflamatoria asociada a la deposición de A β , comenzamos con el estudio inmunohistoquímico de las células microgliales en animales APP y APP/IL4^{-/-} de 6, 9, 12 y 18 meses utilizando el anticuerpo específico para la microglía Iba1 (del inglés *ionized calcium-binding receptor 1*; Ahmed y col., 2007).

Se observó un incremento en la inmunorreactividad para Iba1 en el hipocampo de los animales APP/IL4^{-/-} con respecto a los APP, en especial a partir de los 9 meses de edad (Fig. 3.5.6). Para ambos genotipos se observó un aumento de la reactividad microglial con la edad, disponiéndose esta microglía reactiva Iba1-positiva alrededor de zonas inmunonegativas que corresponden con placas amiloides.

En la Fig. 3.5.7 se muestran imágenes de secciones inmunoteñidas con anti-Iba1 a mayores aumentos del área CA1 hipocampal. Diferentes estados funcionales de la microglía pueden ser definidos morfológicamente. En los animales APP (Fig. 3.5.7A) y en la EA, en general, se observan dos tipos de morfología microglial, una microglía no activada (residente) con largas prolongaciones finas y ramificadas (ver detalle 1 en Fig. 3.5.7; Streit y col., 1998; Latta y col., 2014) y una microglía reactiva que retrae sus prolongaciones haciéndolas más cortas, gruesas y poco ramificadas (ver detalle 2 en Fig. 3.5.7; McGeer y col., 1987). Ésta última microglía se dispone alrededor de las placas de Aβ, mientras que la microglía localizada en las regiones interplaca tiene una morfología ramificada y no activada.

En ambos genotipos hemos observado el incremento en la reactividad microglial, de acuerdo con el aumento en la carga amiloide previamente descrito. Sin embargo, la microglía activada en los animales APP/IL4^{-/-} aparece más inmunorreactiva, lo cual podría indicar una sobreactivación. Por otro lado, las imágenes de detalle para la microglía reactiva alrededor de las placas en los animales APP (detalle 4 en Fig. 3.5.7) y APP/IL4^{-/-} (detalle 5 en Fig. 3.5.7) a los 12 meses de edad, muestran que la microglía en los animales APP es capaz de penetrar más en el interior de la placa que en los animales APP/IL4^{-/-}, observándose en éstos la zona de la placa más inmunonegativa (detalle 4 y 5 en Fig. 3.5.7). Esto parece indicar una menor ramificación de las prolongaciones de la microglía activada en los animales APP/IL4^{-/-}.

En relación a esto último, observamos una mayor esfericidad en la microglía localizada alrededor de las placas en los animales APP/IL4^{-/-} (Fig. 3.5.8). Así, esta microglía mostraba menos ramificaciones (Fig. 3.5.8A-B) y un cuerpo más engrosado (detalles en Fig. 3.5.8C). La evaluación cuantitativa de la morfología microglial se llevó a cabo utilizando el índice de esfericidad descrito por Heppner y col. (1998). La fórmula aplicada es:

$$\text{Índice de esfericidad} = \frac{4\pi \times \text{área celular}}{(\text{perímetro celular})^2}$$

de manera que, en aquellas células con una morfología perfectamente circular, el valor de este índice será de 1, mientras que aquellas células cuya morfología se desvíe del círculo, presentarán un índice menor que 1.

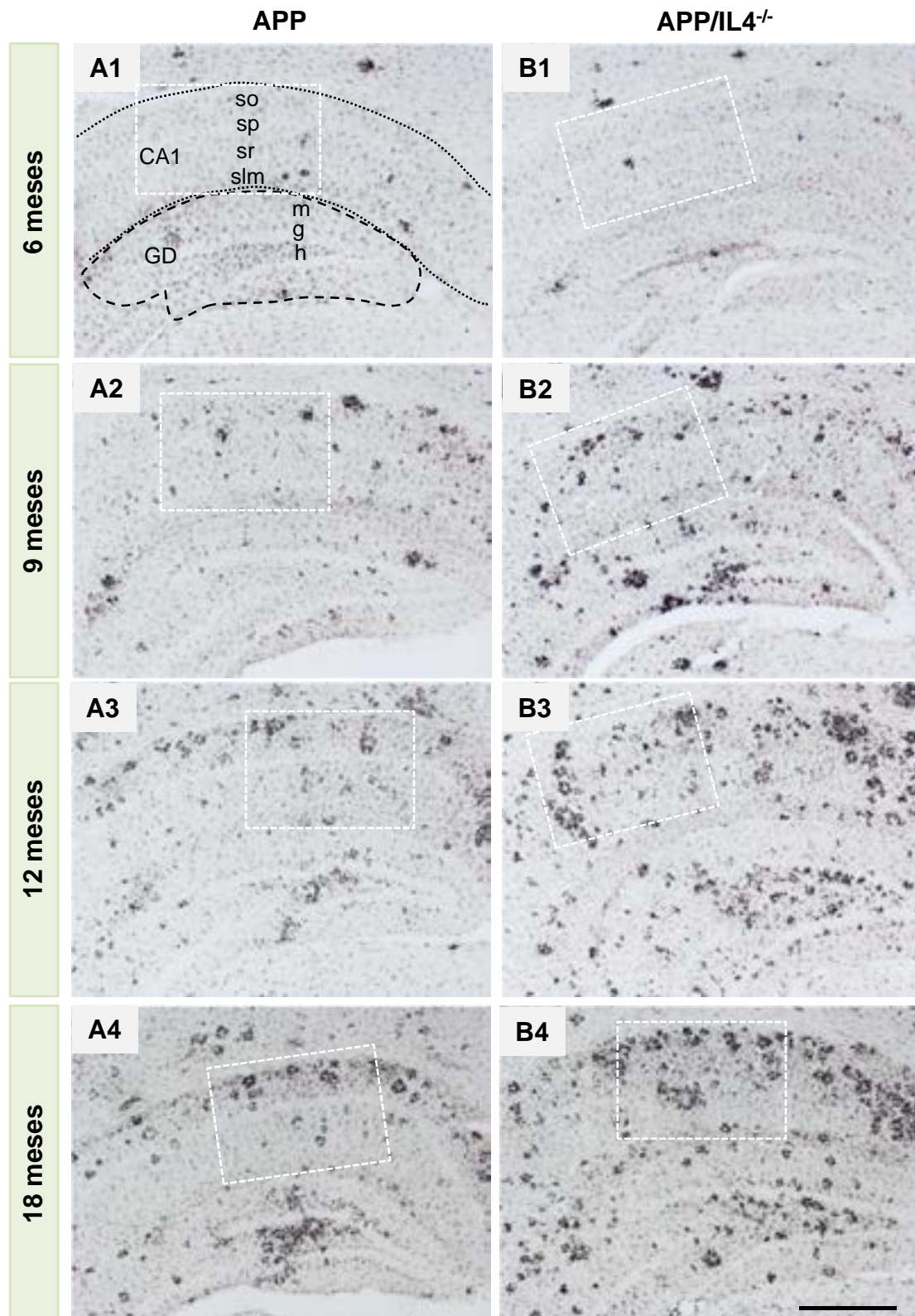


Figura 3.5.6. Aumento de la activación microglial en el hipocampo en los animales APP-APP/IL4^{-/-}. Imágenes de microscopía de campo claro para el marcador microglial Iba1 en los animales APP (A) y APP/IL4^{-/-} (B) a los 6, 9, 12 y 18 meses de edad. Para ambos genotipos se observa un incremento en la reactividad microglial con la edad. Cuando comparamos ambos genotipos a una misma edad, observamos un aumento en la inmunorreactividad para Iba1 en los animales APP/IL4^{-/-} con respecto a los APP, indicando una mayor activación microglial en éstos. Detalles en Fig. 3.5.7 (recuadros blancos). Barra de escala: 500 μ m. GD: giro dentado; so: *stratum oriens*; sp: *stratum pyramidale*; sr: *stratum radiatum*; slm: *stratum lacunosum-moleculare*; m: capa molecular; g: capa granular; h: hilio.

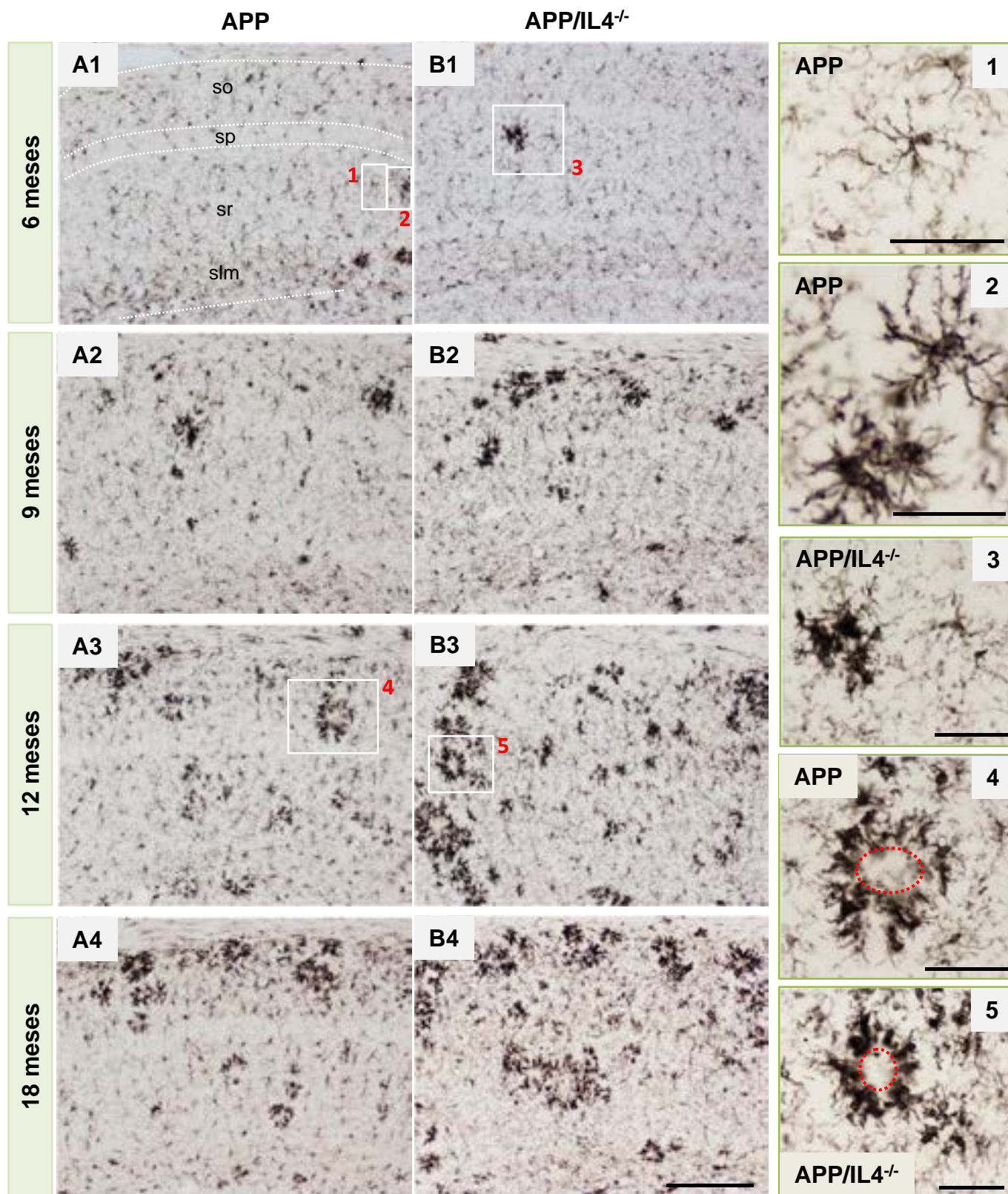


Figura 3.5.7. Activación microglial en los animales APP-APP/IL4^{-/-}. Imágenes de microscopía de campo claro para el marcador microglial Iba1 en la región CA1 de los animales APP (A) y APP/IL4^{-/-} (B) a los 6, 9, 12 y 18 meses de edad. Se observa una mayor inmunorreactividad para Iba1 en los animales APP/IL4^{-/-} comparados con los APP a partir de los 9 meses de edad. Barra de escala: A-B, 200 μ m; detalles, 50 μ m. so: *stratum oriens*; sp: *stratum pyramidale*; sr: *stratum radiatum*; slm: *stratum lacunosum-moleculare*.

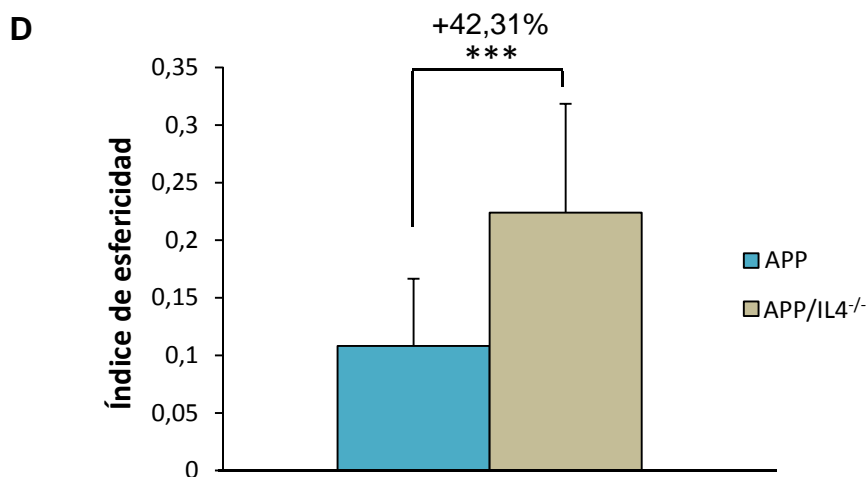
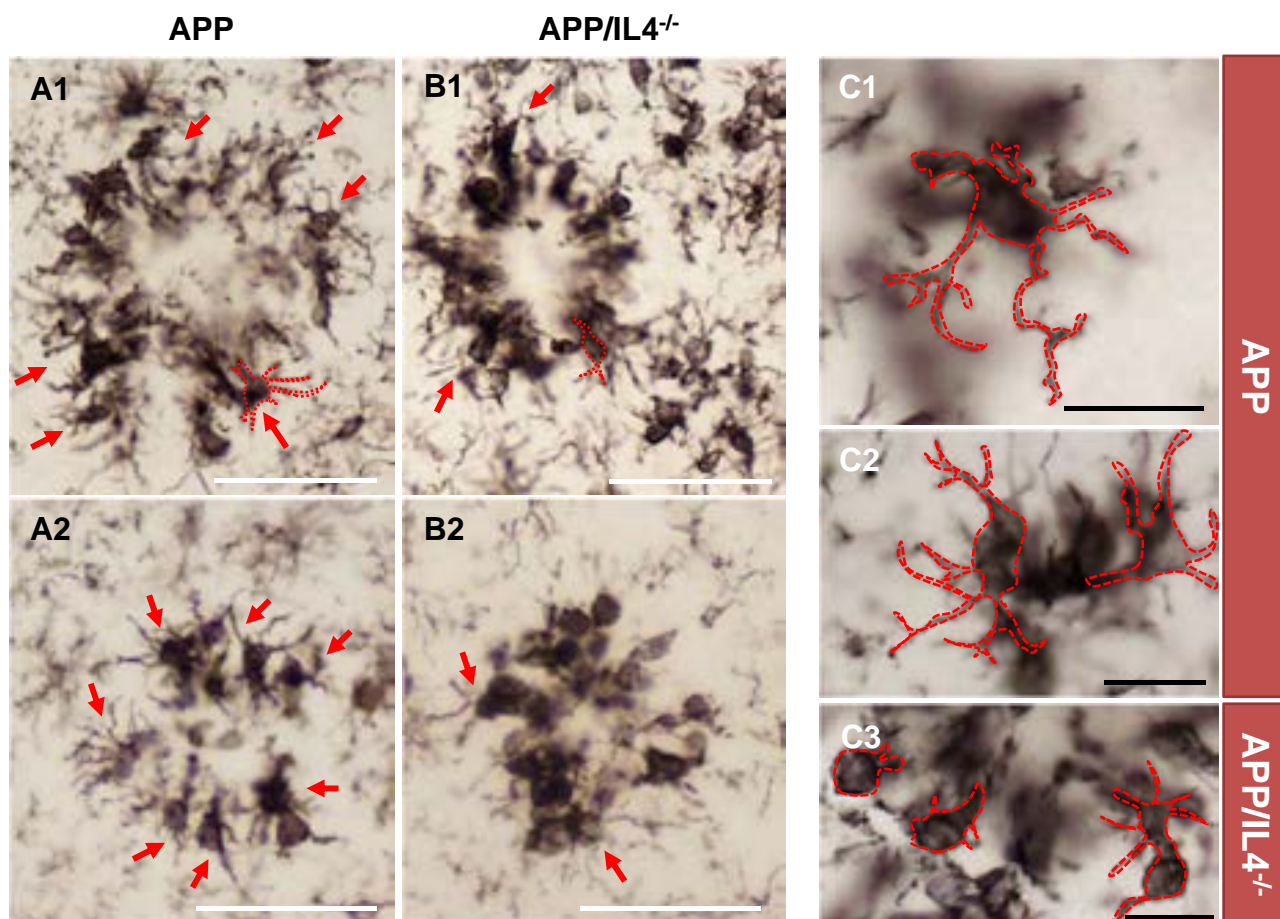


Figura 3.5.8. La microglía activada muestra un aspecto menos ramificado en los animales APP/IL4^{-/-}. Inmunohistoquímica para el marcador microglial Iba-1 en animales APP (A) y APP/IL4^{-/-} (B) de 12 meses de edad. La microglía activada alrededor de las placas presenta más ramificaciones en los animales APP que en los APP/IL4^{-/-} donde las células adquieren una apariencia más redondeada (flechas rojas en A y B y células delimitadas en rojo en A1 y B1). Para detalle de microglía activada alrededor de las placas en APP ver C1 y C2 y en APP/IL4^{-/-} ver C3. El cálculo del índice de esfericidad (D) mostró un incremento del 42,31±27,41% en los animales APP/IL4^{-/-} con respecto a los APP a los 12 meses de edad. Los datos representan la media±SD y fueron analizados mediante un t-test Mann-Whitney p<0,0001, ***p<0,001. n=20 células por grupo. Barra de escala: A-B, 50 µm; C, 14 µm.

Para el cálculo de este índice en nuestros sujetos de estudio, delimitamos la periferia de diferentes células microgliales individuales localizadas alrededor de las placas (Fig. 3.5.8C) y hayamos, mediante el programa de análisis de imagen Visilog, el área celular y el perímetro, obteniendo el índice de esfericidad de cada célula. Aquí, detectamos un incremento en el índice de esfericidad de la microglía en los animales APP/IL4^{-/-} a los 12 meses con respecto a los APP de la misma edad (Fig. 3.5.8D), indicando que las células de la microglía en los animales APP presentan una morfología más ramificada como ya habíamos observado por las imágenes (n=20 células/genotipo; Mann-Whitney, ***p<0,001). Un cambio en la morfología microglial puede ser indicativo de que estas células no estén llevando a cabo su función de manera eficiente, y esa pérdida de integridad puede contribuir al daño tisular.

Este incremento en la inmunorreactividad microglial para Iba1 también se detectó en otras regiones cerebrales altamente afectadas en el Alzheimer, como es el subículo (Fig. 3.5.9).

Esta mayor inmunorreactividad para Iba1 en los animales APP/IL4^{-/-}, ha sido corroborada mediante técnicas moleculares, obteniéndose, mediante RT-PCR, un incremento en la expresión de Iba1 en el hipocampo de los animales APP/IL4^{-/-} con respecto a los APP a partir de los 12 meses de edad (Fig. 3.5.10A). Asimismo, se ha obtenido también un incremento en la expresión del marcador CD45 microglial en el hipocampo de los animales APP/IL4^{-/-} (Fig. 3.5.10B), también a partir de los 12 meses (n=6 animales/grupo; ADEVA de 1 vía, *post-hoc* de Tukey, *p<0,05).

El siguiente paso consistió en determinar si la delección de la IL-4 conduce a un incremento en el fenotipo M1 microglial (activación clásica; Fig. 3.5.11). En este sentido, se ha observado un aumento en la expresión de su marcador típico, el TNF- α (Fig. 3.5.11A; aunque este incremento solo fue significativo a los 9 meses de edad, observándose una tendencia a los 18 meses). También se detectó un incremento en los niveles de expresión de la IL-6 (Fig. 3.5.11B), igualmente característica del estadio clásico de activación microglial, a los 6 y 9 meses de edad (n=4 animales/grupo; ADEVA de 1 vía, *post-hoc* de Tukey, *p<0,05).

El siguiente paso consistió en comprobar si la falta de expresión de IL-4 tenía también un efecto sobre la astrogliosis (Fig. 3.5.12). Los astrocitos responden a un estímulo patológico a través de una gliosis reactiva (Burda y Sofroniew, 2014) y se localizan alrededor de las placas de A β (ver revisión Medeiros y LaFerla, 2013; Heppner y col., 2015). Las imágenes microscópicas de la inmunohistoquímica para GFAP (marcador de astrocitos; del inglés *glial fibrillary acidic protein*) mostraron un patrón de inmunomarcaje similar para ambos genotipos, apreciándose un incremento de la inmunorreactividad con la edad. La reactividad es mayor alrededor de las placas. Así, la astrogliosis no reactiva muestra una ramificación mayor (Fig. 3.5.12C, D y F) que la reactiva localizada alrededor de las placas que además muestra un cuerpo y prolongaciones más engrosadas (Fig. 3.5.12E y G).

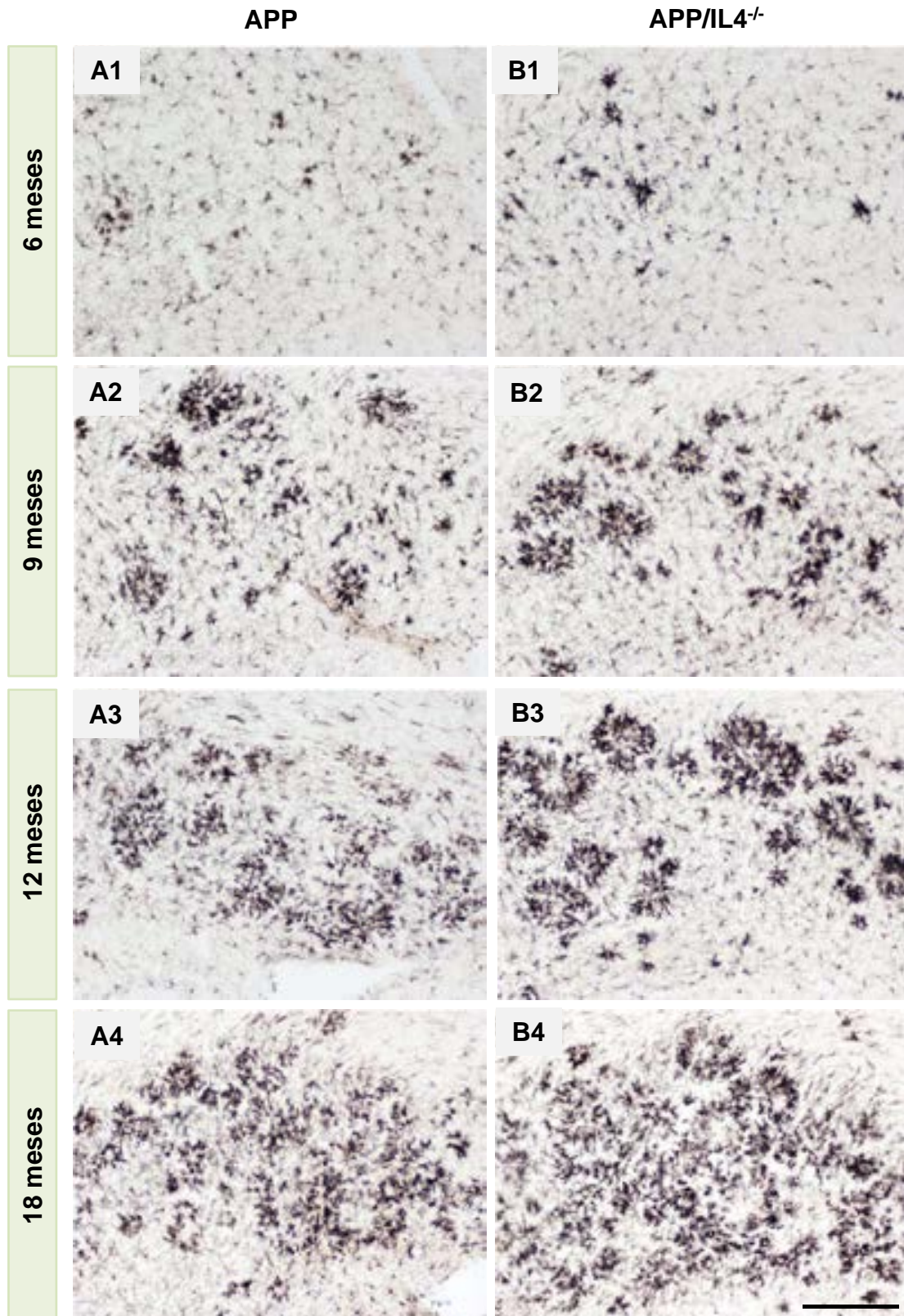


Figura 3.5.9. Activación microglial en el subículo de los animales APP-APP/IL4^{-/-}. Imágenes de microscopía de campo claro para el marcador microglial Iba1 en el *subiculum* de los animales APP (A) y APP/IL4^{-/-} (B) a los 6, 9, 12 y 18 meses de edad. Se observa una mayor inmunorreactividad para Iba1 en los animales APP/IL4^{-/-} comparados con los APP a partir de los 9 meses de edad. Barra de escala: A-B, 200 μ m.

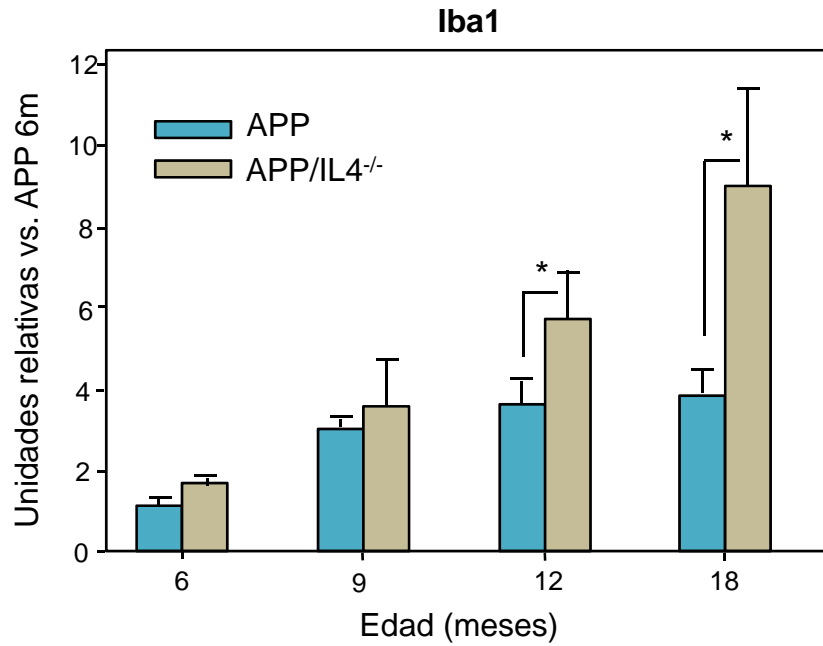
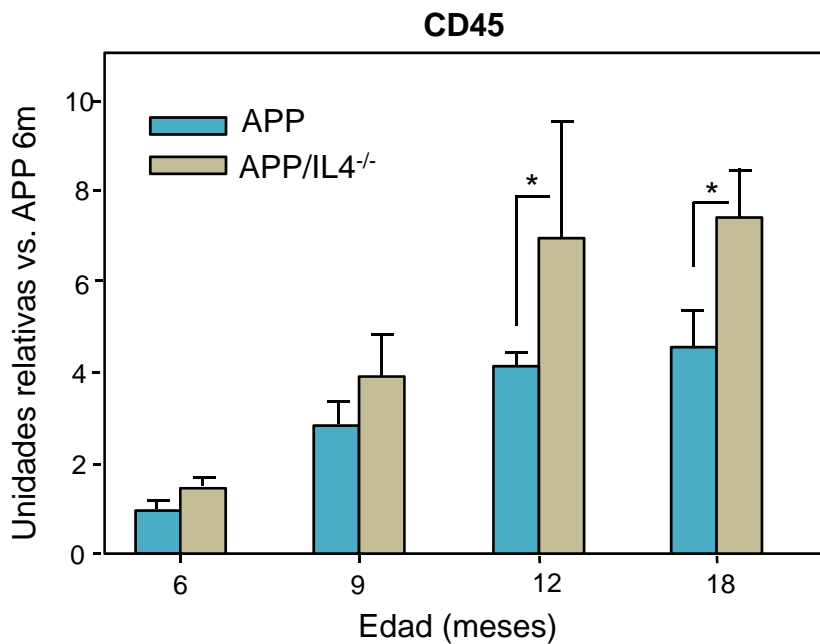
A**B**

Figura 3.5.10. Incremento en los niveles de expresión (ARNm) para los marcadores microgliales Iba1 y CD45 en los animales APP/IL4^{-/-}. Los animales APP/IL4^{-/-} muestran un incremento significativo de Iba1 (A) y CD45 (B) a partir de los 12 meses de edad, medido por RT-PCR. Datos representados por media±SD y relativizados con los niveles de expresión de los animales APP a los 6 meses de edad. ADEVA de 1 vía (para Iba1, $F(7,27)=23,04$, $p=0,00001$; para CD45, $F(7,27)=23,65$, $p=0,00001$), seguido de un *post-hoc* de Tukey, * $p<0,05$. $n=6$ animales/grupo.

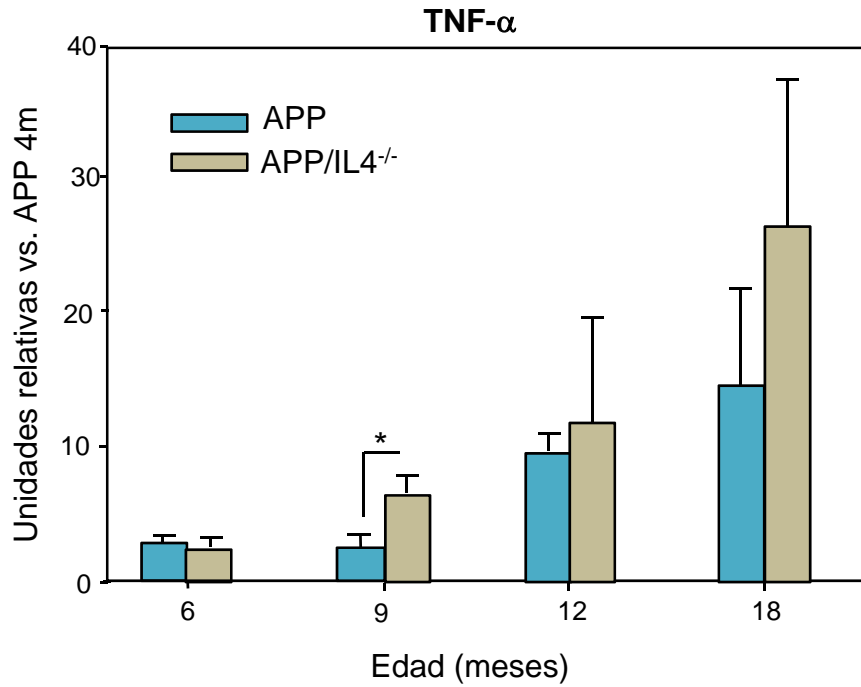
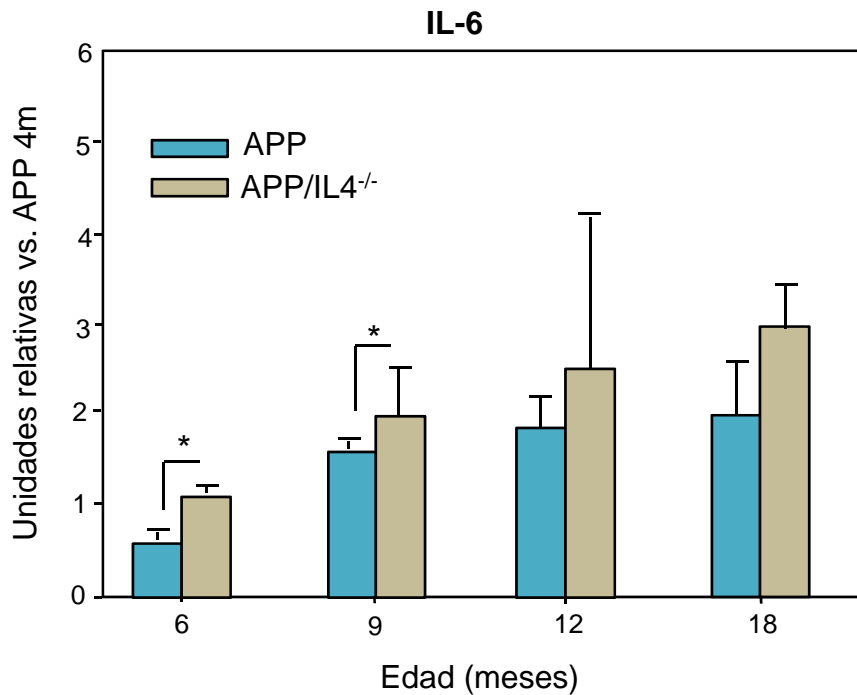
A**B**

Figura 3.5.11. La microglía muestra un fenotipo de activación clásico M1 en los animales APP/IL4^{-/-}. Los animales APP/IL4^{-/-} muestran una mayor expresión de TNF- α (A) e IL-6 (B) con respecto a los APP, aunque solo se obtuvieron diferencias significativas a las edades más tempranas. Esto indica que la delección de IL-4 (característica del fenotipo alternativo de activación microglial) hace que la respuesta inflamatoria tenga un fenotipo más clásico en los animales APP/IL4^{-/-}. Datos representados por media \pm SD y relativizados con los niveles de expresión de los animales APP a los 4 meses de edad. ADEVA de 1 vía (para TNF- α , $F(4,17)=3,62$, $p<0,05$; para IL-6, $F(4,177)=2,05$, $p<0,05$), seguido de un *post-hoc* de Tukey, * $p<0,05$. $n=4$ animales/grupo.

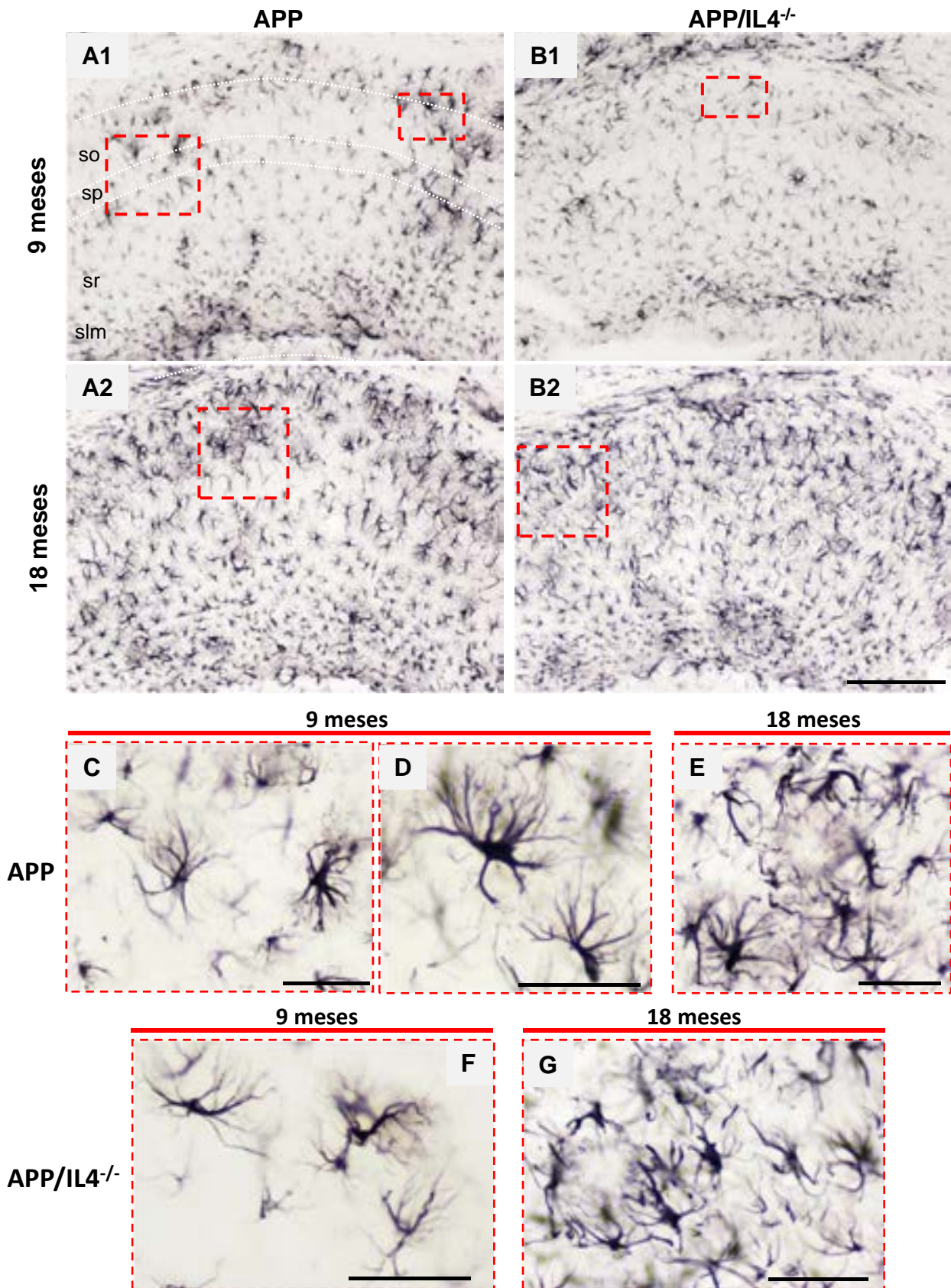


Figura 3.5.12. Activación astrogliar en el hipocampo de los animales APP-APP/IL4^{-/-}. Imágenes de microscopía de campo claro para el marcador astrogliar GFAP en la región CA1 del hipocampo de los animales APP (A) y APP/IL4^{-/-} (B) a los 9 y 18 meses de edad. No se observaron diferencias aparentes en la reactividad astrogliar entre los animales APP y APP/IL4^{-/-} a las edades estudiadas. Barra de escala: A-B, 200 μ m; C-E, 50 μ m.

No se detectaron cambios aparentes en la inmunotinción para GFAP en la astrogía de los animales con delección de IL-4 respecto a los controles.

En relación a lo descrito en las Fig. 3.5.8 sobre la morfología microglial alrededor de las placas, decidimos analizar la relación entre la microglía, astrogía y las placas amiloides (Fig. 3.5.13). Para ello, realizamos una triple inmunofluorescencia con marcadores de la astrogía (GFAP), microglía (Iba1) y la placa amilodíe (A β 42). En las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal, se volvió a poner de manifiesto la menor ramificación de la microglía alrededor de las placas en los animales APP/IL4^{-/-} con respecto a los APP (detalle en Fig.3.5.13C2-C3 para APP en comparación con Fig.3.5.13D2 para APP/IL4^{-/-}). Sin embargo, no se detectó ninguna diferencia aparente en la relación de los astrocitos con la placa.

3.5.3. Incremento de la patología axonal en los animales APP/IL4^{-/-}

La presencia de neuritas distróficas es una de las principales marcas histopatológicas de la EA y se ha correlacionado con el declive cognitivo (Perez-Nievas y col., 2013). En concreto, las distrofias axonales han sido extensamente descritas en el hipocampo y la corteza entorrinal de pacientes de la EA, tanto en estadios tempranos como tardíos (Dickson y col., 1999; Bell y Cuello, 2006), así como en modelos transgénicos de la EA (Boutajangout y col., 2004; Noda-Saita y col., 2004; Woodhouse y col., 2009; Sanchez-Varo y col., 2012; Trujillo-Estrada y col., 2014). Estos procesos alterados son inmunopositivos para un gran abanico de marcadores relacionados con todo tipo de funciones neuronales, como proteínas sinápticas, citoesqueleto, APP, ubiquitina, autofagia, etc. (Cras y col., 1991; Dickson y col., 1999).

En el modelo APP la mayoría de las placas contienen neuritas distróficas inmunorreactivas para APP, sinaptofisina, neurofilamento y Tau (Rockenstein y col., 2001). Además, este modelo presenta daño neuronal dependiente de la edad, especialmente a partir de los 14 meses (Rutten y col., 2005; Lull y col., 2011) y déficits cognitivos a partir de los 6 meses (Faizi y col., 2012).

En relación a lo comentado anteriormente, hemos analizado la relación entre la microglía y las distrofias axonales (Fig. 3.5.14). En el modelo APP se observaron un menor número de distrofias positivas para APP (Fig. 3.5.14A) en comparación con los APP/IL4^{-/-} (Fig. 3.5.14B). Mediante una triple inmunohistoquímica para microglía, distrofias APP-positivas y placas, se corroboró la disposición de la microglía reactiva alrededor de las placas amiloides (Fig. 3.5.14C). Debido a la mayor ramificación de las prolongaciones de la microglía en los animales APP, estas células actuarían como una barrera limitando el contacto de las placas amiloides con el neuropilo, como ha sido descrito previamente por Condello y col. (2015), algo que no ocurre en los animales APP/IL4^{-/-}, lo que podría explicar el mayor número de distrofias APP-positivas observadas en estos animales.

GFAP/Iba1/A β 2

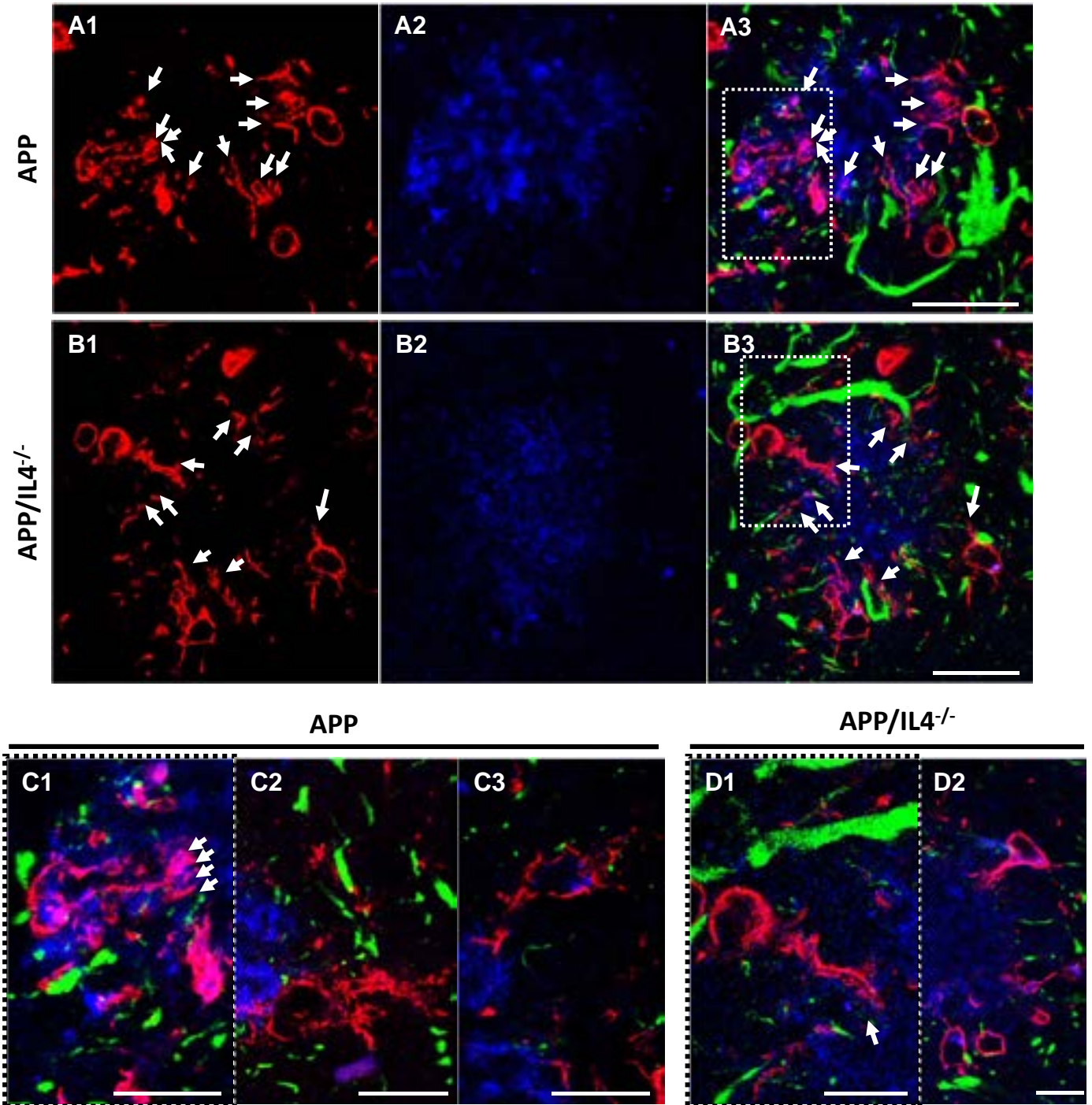


Figura 3.5.13. Activación glial alrededor de las placas en el hipocampo. Triple inmunohistoquímica fluorescente para GFAP (verde), Iba1 (rojo) y A β 2 (azul) en animales APP (A y C) y APP/IL4^{-/-} (B y D) de 12 meses de edad. Alrededor de las placas de A β 2 se produce la activación microglial y astroglial. En los animales APP/IL4^{-/-} se produce una menor interdigitación entre las fibras amiloides y las ramificaciones microgliales (flechas blancas y detalles C1 y D1) mostrando la microglía un aspecto más esférico (D2), mientras que la microglía de los animales APP muestra un aspecto más ramificado (C2-C3). Barra de escala: A-B, 20 μ m; C-D, 10 μ m.

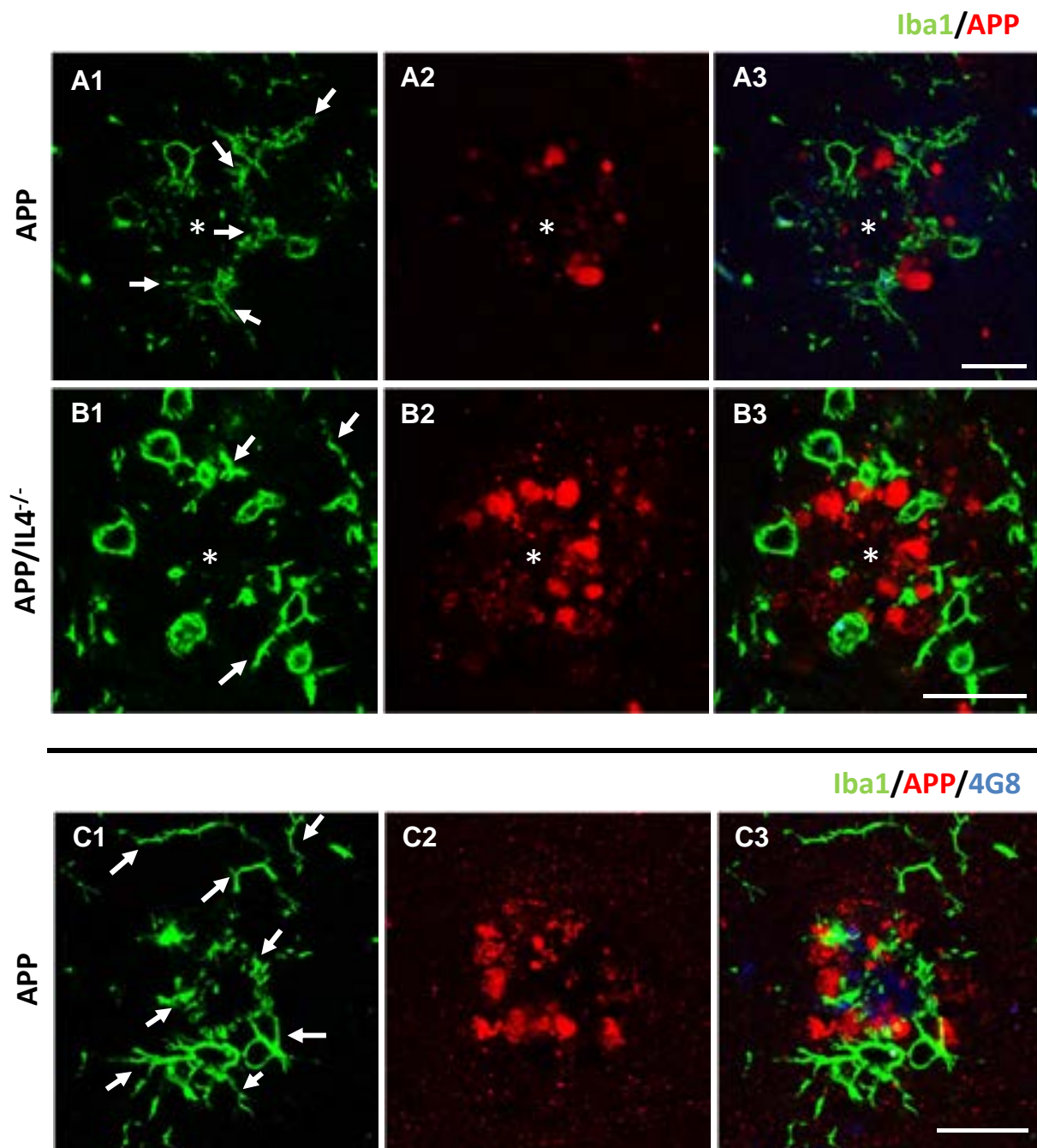


Figura 3.5.14. Activación glial y patología distrófica alrededor de las placas en el hipocampo. A-B) Doble inmunohistoquímica fluorescente para Iba1 (verde) y APP (rojo) en animales APP (A) y APP/IL4^{-/-} (B) de 12 meses de edad. Se ha observado un mayor número de distrofias APP-positivas en los animales APP/IL4^{-/-} con respecto a los APP a los 12 meses de edad, dispuestas alrededor de las placas (asterisco blanco). La microglía aparece menos ramificada en los animales APP/IL4^{-/-} (flechas blancas). C) La disposición de las distrofias APP-positivas y la microglía activada alrededor de las placas se confirmó mediante una triple inmunohistoquímica para Iba1 (verde), APP (rojo) y el marcador de Abeta 4G8 (azul). Barra de escala: 20 μ m.

Como hemos comentado, las placas amiloides y las distrofias axonales asociadas a ellas constituyen los primeros eventos patológicos que acontecen, desde edades muy tempranas, en este modelo transgénico APP (Rockenstein y col., 2001), habiéndose detectado distrofias para APP y Tau.

Los depósitos fibrilares extracelulares de A β y las neuritas distróficas asociadas fueron visualizados realizando un marcaje inmunohistoquímico para APP y una contratinción con rojo congo en secciones de hipocampo de animales APP y APP/IL4^{-/-} de 12 meses de edad (Fig. 3.5.15). En las imágenes se puede observar la presencia de cuerpos neuronales APP-positivos en las capas de células piramidales de CA1 (Fig. 3.5.15A1-B1) y CA3 (Fig. 3.5.15A2-B2) y en la capa granular del giro dentado (Fig. 3.5.15A3-B3). En general, casi la totalidad de las placas teñidas con rojo congo se encuentran rodeadas por distrofias APP-positivas. Se aprecia un incremento en el número de distrofias APP en los animales APP/IL4^{-/-} con respecto a los animales APP en estas tres regiones. De hecho, las imágenes de detalle (Fig. 3.5.15C1-C4) muestran la estrecha asociación de las distrofias con las placas de A β y el incremento en el número de distrofias en los animales APP/IL4^{-/-}. Así, por ejemplo, podemos ver que, incluso una placa de un tamaño menor en la región CA3 de un animal APP/IL4^{-/-} de 12 meses (Fig. 3.5.15C4), muestra un mayor número de distrofias APP-positivas, que una placa de un tamaño superior en un animal APP de la misma edad (Fig. 3.5.15C3).

Los modelos animales carentes de mutaciones en la proteína Tau, como nuestro modelo APP, no desarrollan ovillos neurofibrilares, una de las principales lesiones histopatológicas de la enfermedad, aunque si acumula fosfo-Tau en las distrofias. Por ello, hemos estudiado la patología de Tau utilizando el anticuerpo monoclonal AT8 que permite la visualización de la proteína Tau fosforilada en los residuos Ser202/Thr205. La tinción inmunohistoquímica en los animales APP y los APP/IL4^{-/-} de 12 meses de edad (Fig. 3.5.16) mostró que existen neuritas distróficas AT8-positivas tanto en el hipocampo propio como en el subículo de estos animales. Estas neuritas son de pequeño tamaño y de aspecto elongado. La contratinción con rojo congo mostró que la acumulación de la proteína Tau fosforilada ocurría principalmente en torno a los depósitos amiloides. Se puede observar, un incremento en el número de distrofias positivas para AT8 en los animales APP/IL4^{-/-} (Fig. 3.5.16B) en comparación con los APP (Fig. 3.5.16A) tanto en la región de CA1 del hipocampo propio como en el subículo. De hecho en las imágenes de detalle (Fig. 3.5.16C) se pueden observar placas de tamaño similar para ambos genotipos en CA1 (Fig. 3.5.16C1-C2) y en el subículo (Fig. 3.5.16C3-C4), apreciándose el incremento en el número de distrofias en los animales APP/IL4^{-/-} en ambas regiones, independientemente del tamaño de los depósitos de A β .

Por último, y dado que la presencia de neuritas distróficas positivas para Ubiquitina ha sido descrita en cerebros de pacientes de la EA (Perry y col., 1987; Lowe y col., 1988) y

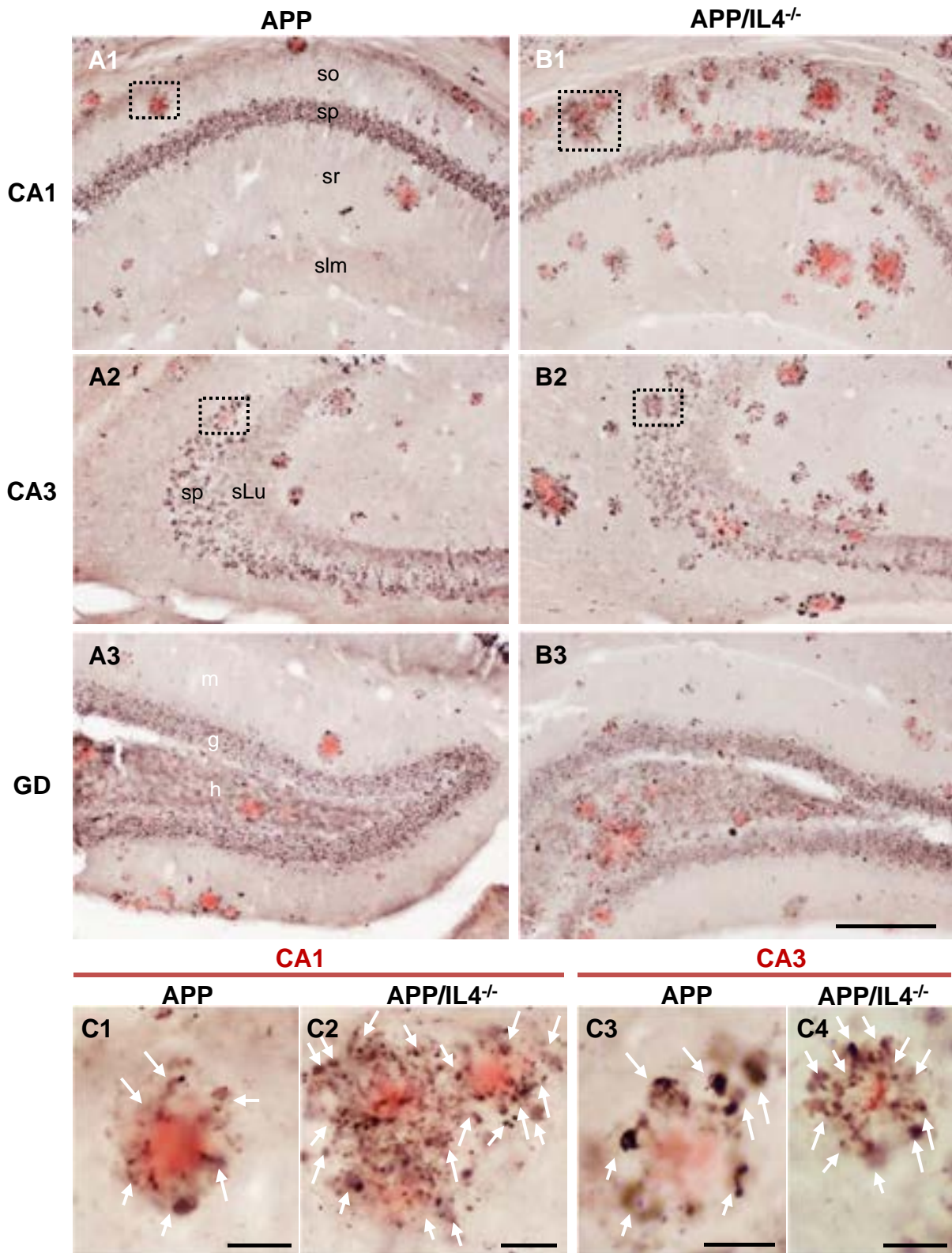


Figura 3.5.15. Aumento de la patología axonal en el hipocampo de los animales APP/IL4^{-/-}. Imágenes representativas de secciones hipocampales inmunotñidas con un anticuerpo para APP (contratinción con rojo congo para las placas de A β) de ratones APP (A) y APP/IL4^{-/-} (B) a los 12 meses de edad. Se observa un incremento en las distrofias APP-positivas en los animales APP/IL4^{-/-}, en comparación con los APP, en las distintas regiones analizadas (CA1, CA3 y GD). En las imágenes de detalle, podemos observar este incremento en el número de neuritas distróficas APP (flechas blancas) alrededor de las placas en los animales APP/IL4^{-/-} (C2 y C4) con respecto a los APP (C1 y C3). Barras de escala: A-B, 2000 μ m; C, 25 μ m. GD: giro dentado; so: *stratum oriens*; sp: *stratum pyramidale*; sr: *stratum radiatum*; slm: *stratum lacunosum-moleculare*; sLu: *stratum lucidum*; m: capa molecular; g: capa granular; h: hilio.

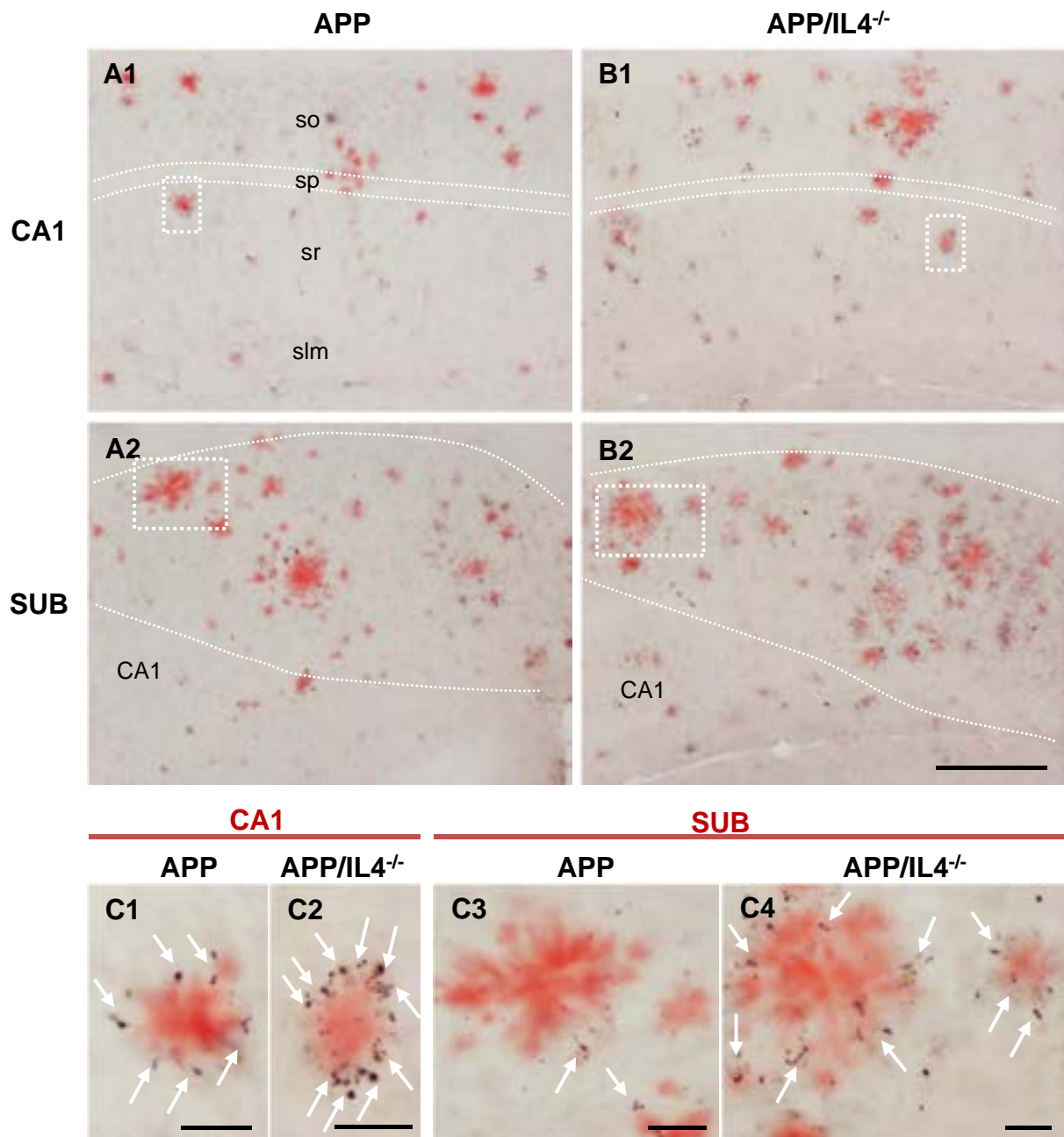


Figura 3.5.16. Aumento de distrofias axonales positivas para fosfo-Tau (AT8) en el hipocampo de animales APP/IL4^{-/-}. Imágenes representativas de secciones inmunoteñidas AT8 (contratinción con rojo congo para las placas de A β) de ratones APP (A) y APP/IL4^{-/-} (B) a los 12 meses de edad. Se observa un incremento en las distrofias AT8-positivas en los animales APP/IL4^{-/-}, en comparación con los APP, en las distintas regiones analizadas (CA1 y *subiculum*). En las imágenes de detalle (C), podemos observar este incremento en el número de neuritas distróficas AT8 (flechas blancas) alrededor de las placas en los animales APP/IL4^{-/-} (C2 y C4) con respecto a los APP (C1 y C3), incluso en placas de tamaño similar. Barras de escala: A-B, 200 μ m; C, 25 μ m. so: *stratum oriens*; sp: *stratum pyramidale*; sr: *stratum radiatum*; slm: *stratum lacunosum-moleculare*; SUB: *subiculum*.

modelos transgénicos (Torres y col., 2012), decidimos estudiarlas en nuestros sujetos (Fig. 3.5.17), ya que la afectación de los sistemas de degradación proteica intracelular es una característica de la enfermedad de Alzheimer. Para ello, se realizó una inmunohistoquímica para Ubiquitina con una contratinción con rojo congo para poner de manifiesto las placas amiloides. En los animales APP y APP/IL4^{-/-} se encontraron neuritas distróficas con acumulación de proteínas ubiquitinadas alrededor de los depósitos de A β a los 12 meses de edad, tanto en el área CA1 del hipocampo como en el subículo. El número de distrofias era aparentemente mayor en los animales APP/IL4^{-/-} que en los APP a la edad estudiada (ver detalle en Fig. 3.5.17C).

El incremento, cualitativo, de neuritas distróficas (tanto para APP como para AT8 y Ubiquitina) en los animales APP/IL4^{-/-} con respecto a los APP de la misma edad, es indicativo de una mayor patología axonal/sináptica y por tanto una mayor vulnerabilidad neuronal de estos animales.

DISCUSIÓN

En este estudio, hemos demostrado que la deficiencia de la citoquina antiinflamatoria IL-4 exacerba la patología amiloide y aumenta la formación de distrofias axonales en un modelo transgénico APP de la enfermedad de Alzheimer.

Se ha propuesto un papel neuroprotector de las citoquinas antiinflamatorias en la EA. En este sentido, IL-4 es la citoquina típica usada para inducir un fenotipo de activación microglial alternativo (Stein y col., 1992; ver revisión Cherry y col., 2014), y, además, parece participar en la función cognitiva regulando el aprendizaje y la memoria (Derecki y col., 2010). El papel de IL-4 en la EA está poco estudiado, aunque parece intervenir en numerosos efectos beneficiosos en modelos animales de envejecimiento y de la enfermedad (Lyons y col., 2007; Cao y col., 2009), mediando los efectos neuroprotectores de tratamientos como la rosiglitazone (Loane y col., 2009) y la atorvastatina (Clarke y col., 2008). Además, se ha demostrado una función protectora de IL-4 en el daño de la médula espinal (Kigerl y col., 2009) y el derrame cerebral (Xiong y col., 2011). Sin embargo, la expresión de IL-4 disminuye en el modelo Tg2576 de la EA (Abbas y col., 2002) y en ratas durante el envejecimiento (Nolan y col., 2005). De ahí el interés del estudio de la implicación de esta interleuquina en la evolución de las lesiones histopatológicas características de la EA.

Una de las primeras lesiones histopatológicas de la EA es la acumulación y agregación extracelular del péptido β -amiloide formando las placas. Por ello, nuestro primer objetivo fue determinar el papel de la supresión de la expresión de IL-4 sobre la carga amiloide en el modelo APP. Este modelo se caracteriza por desarrollar placas amiloides a partir de los 3-4 meses de edad, aumentando de forma progresiva con la edad, apareciendo los primeros depósitos en el hipocampo a los 5-7 meses (Rockenstein y col.,

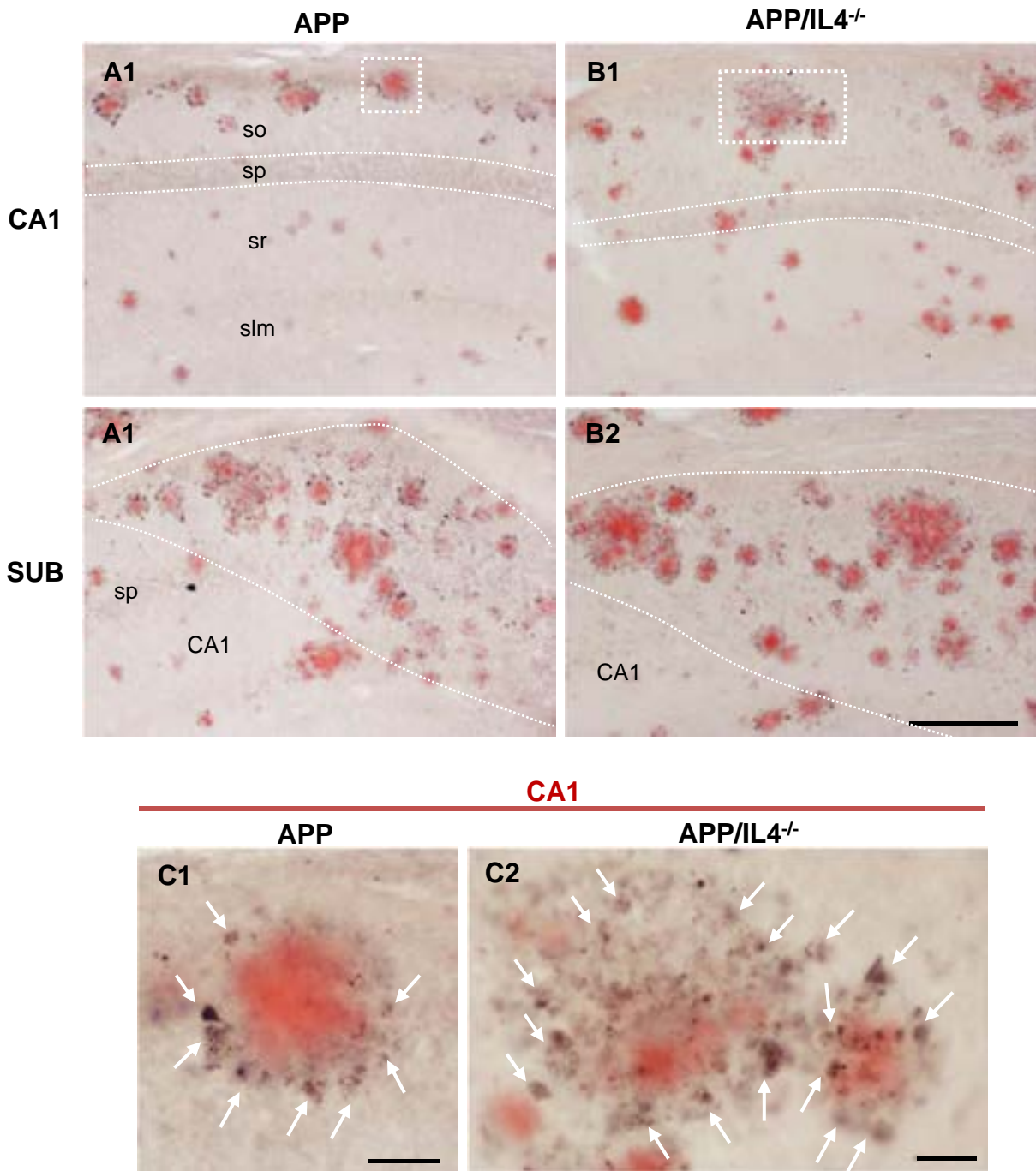


Figura 3.5.17. Patología distrófica asociada a placas de Abeta en los animales APP-APP/IL4^{-/-}. Imágenes representativas de secciones inmunoteñidas con un anticuerpo para Ubiquitina (contratinción con rojo congo para las placas de Aβ) de ratones APP (A) y APP/IL4^{-/-} (B) a los 12 meses de edad. Se observa un incremento en las distrofias positivas para este marcador en los animales APP/IL4^{-/-}, en comparación con los APP, en las distintas regiones analizadas (CA1 y *subiculum*). En las imágenes de detalle (C), podemos observar este incremento en el número de neuritas distróficas (flechas blancas) alrededor de las placas en los animales APP/IL4^{-/-} (C2) con respecto a los APP (C1). Barras de escala: A-B, 200 μm; C, 25 μm. so: *stratum oriens*; sp: *stratum pyramidale*; sr: *stratum radiatum*; slm: *stratum lacunosum-moleculare*; SUB: *subiculum*.

2001). En este trabajo de Tesis doctoral, hemos demostrado un incremento en la carga amiloide, mediante técnicas histológicas y moleculares, en los animales APP/IL4^{-/-} con respecto a los APP a partir de los 9 meses de edad. Este aumento en la carga amiloide no se debe a un mayor tamaño de los depósitos de A β , sino a un mayor número (densidad numérica) de los mismos.

Las formas oligoméricas del β -amiloide son las más tóxicas (Walsh y col., 2002; Shankar y col., 2008), y aunque aún se desconoce el origen intra- o extracelular de estas formas de Abeta, es posible que las placas puedan liberar estos oligómeros hacia al parénquima (Nuñez-Díaz, 2014). En relación a esto, análisis bioquímicos, mediante *dot-blot*, de los niveles de A β oligomérico en las fracciones solubles S1 de muestras hipocampales (Fig. 3.5.18), utilizando el anticuerpo policlonal OC mostraron un incremento significativo en la cantidad de oligómeros en los animales APP/IL4^{-/-}, en relación con los APP, a partir de los 9 meses de edad.

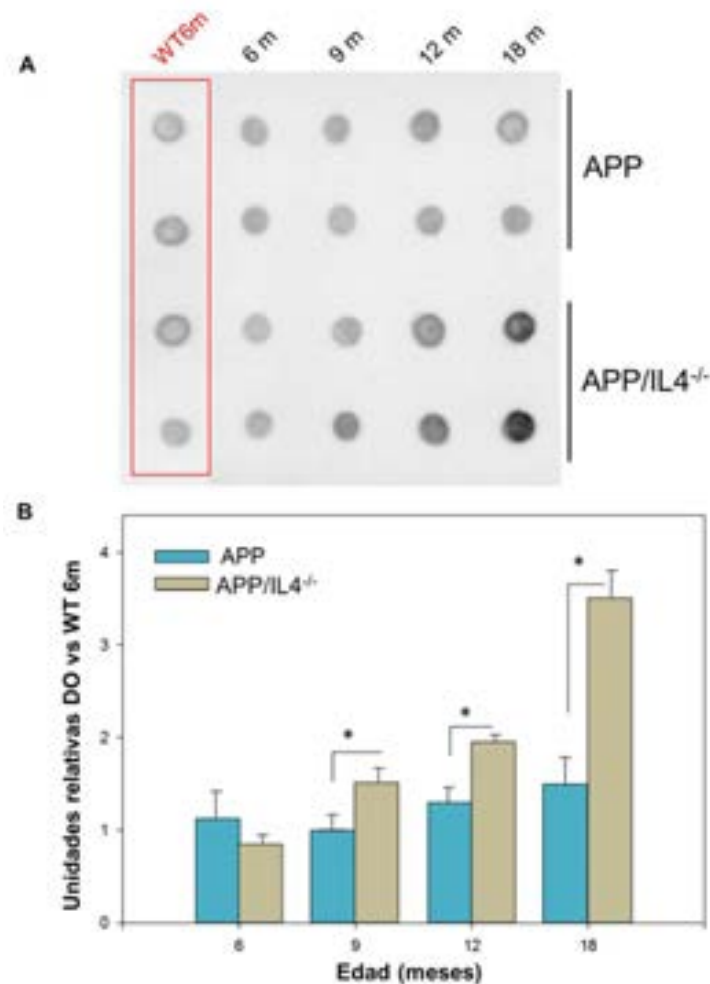


Figura 3.5.18. Niveles de oligómeros solubles de Abeta en el hipocampo.

A) *Dot-blots* representativos, utilizando el anticuerpo OC, de las fracciones solubles S1 del hipocampo de los animales APP y APP/IL4^{-/-} de 6, 9, 12 y 18 meses. B) La cuantificación reveló un incremento significativo en los niveles de Abeta oligomérico (OC-positivos) en dicha fracción en los animales APP/IL4^{-/-} con respecto a los APP a partir de los 9 meses de edad. Los datos representan la media \pm SD y fueron analizados por un ADEVA de 1 vía ($F(3,9)=128,07$, $p<0,0001$), seguido de un *post-hoc* de Tukey, $*p<0,05$. $n=6$ animales por grupo (Datos cedidos por el Dr. Vitorica, Universidad de Sevilla).

Este aumento en los niveles de oligómeros solubles de Abeta en el hipocampo del modelo APP/IL4^{-/-} puede ser el agente causal responsable de la mayor activación

microglial observada, y por otro lado también puede provocar un efecto perjudicial directo sobre las neuronas afectando su viabilidad.

El aumento en los niveles de A β extracelular (en forma de depósitos insolubles o especies solubles tóxicas) puede deberse a un desbalance entre su producción/eliminación, tanto por un aumento en su formación, oligomerización, como por fallos en su degradación/aclaramiento.

En relación con la degradación/aclaramiento del A β , se conocen diversas enzimas proteolíticas (ver Apdo. 1.1.3.4.4 de la Introducción) como la enzima degradadora de insulina o la neprelisina, que participan en este proceso. Además, en la eliminación de este péptido también participan las células de la microglía que internalizan el A β a través de diversos receptores de membrana (ver revisión Yu y Ye, 2015) como el CD14, CD36, CD47, el receptor *scavenger* de clase AI (*Scara1*) y BI (*Sacarb1*), el receptor RAGE (del inglés *receptor for advanced glycosilation end products*) y receptores tipo *toll* (TLRs) (El Khoury y col., 1996; Paresce y col., 1996; Du y col., 1997; Fassbender y col., 2004; Koenigsnecht y Landreth, 2004; Stewart y col., 2010; Thanopoulou y col., 2010; Frenkel y col., 2013; Sheedy y col., 2013). La pérdida de proteostasis microglial se considera una marca del envejecimiento (ver revisión Mosher y Wyss-Coray, 2014). Un estudio reciente ha mostrado que la capacidad fagocítica microglial está dañada en los estadios tardíos de la amiloidosis cerebral (Krabbe y col., 2013) y estudios *in vitro* han mostrado que la microglía internaliza menos A β con el envejecimiento. En este sentido, la microglía de animales PS1/APP también tiene una menor expresión de receptores de unión a A β y de enzimas degradadoras de este péptido (Hickman y col., 2008).

El análisis de expresión del receptor *scavenger* CD36 mostró una reducción de sus niveles en los animales APP/IL4^{-/-} en comparación con los APP a los 6 y 18 meses de edad (Fig. 3.5.19). Se trata de un receptor de membrana implicado en la fagocitosis microglial de A β (ver revisión Yu y Ye, 2015). La menor expresión de CD36 en los animales APP/IL4^{-/-} puede ser responsable, al menos en parte, de la mayor carga amiloide encontrada en estos animales, debido a una reducción en el proceso fagocítico. A favor de esta hipótesis está el cambio morfológico en la microglía, ya que una reducción en sus prolongaciones puede ser indicativo de una menor capacidad fagocítica; no obstante serían necesarios otros análisis para comprobar si el cambio morfológico conlleva un cambio funcional. En apoyo a estos resultados, se ha mostrado que la administración de IL-4 provoca un incremento en la expresión de CD36 y de la fagocitosis y eliminación del péptido β -amiloide (Kawahara y col., 2012).

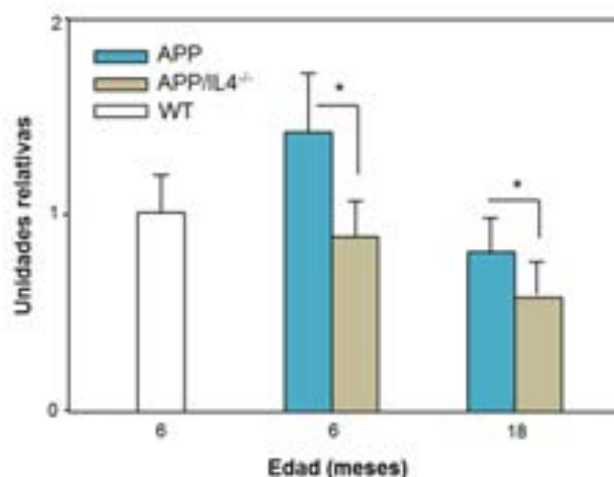


Figura 3.5.19. La expresión del marcador microglial CD36 está reducida en los animales APP/IL4^{-/-}. Los niveles de expresión del receptor *scavenger* CD36 microglial, medidos por RT-PCR, muestran una reducción significativa en los animales APP/IL4^{-/-} a partir de los 6 meses de edad. Los datos representan la media±SD y fueron analizados por un ADEVA de 1 vía ($F(4,17)=13,13$, $p<0,0001$), seguido de un *post-hoc* de Tukey, $*p<0,05$. $n=5$ animales por grupo (Datos cedidos por el Dr. Vitorica, Universidad de Sevilla).

Como hemos comentado, existe un cambio en la morfología microglial en los animales APP/IL4^{-/-} con respecto a los APP de la misma edad. Ya es conocido que la microglía alrededor de las placas adquiere una morfología activada, caracterizada por prolongaciones más cortas, gruesas y menos ramificadas. Pero además, esto se encuentra exacerbado en los animales APP/IL4^{-/-}, en los que la microglía situada alrededor de las placas tiene una apariencia más esférica con menos prolongaciones y es más inmunorreactiva para el marcador Iba1. Se ha descrito que los mecanismos de la EA pueden exacerbar los efectos del envejecimiento en la morfología microglial. Así, por ejemplo, el modelo transgénico APP muestra con el envejecimiento cuerpos celulares más grandes y prolongaciones más cortas en comparación con los transgénicos jóvenes (Koenigsnecht-Talboo y col., 2008). Los mecanismos que subyacen a estos cambios morfológicos son desconocidos (Mosher y Wyss-Coray, 2014).

En relación a la activación microglial, hemos observado una mayor inmunorreactividad para Iba1 en los animales APP/IL4^{-/-} con respecto a los APP, así como una mayor expresión de este marcador, medida mediante RT-PCR. Asimismo, hemos determinado un aumento de la expresión del marcador de activación microglial CD45 en los animales APP/IL4^{-/-}.

Debido que a los 12 meses la patología amiloide es bastante abundante y es a la edad a la que se produce un claro incremento de la expresión de los marcadores microgliales en los animales APP/IL4^{-/-} con respecto a los APP, se ha seleccionado esta edad en aquellos análisis en los que no se haya evaluado la progresión dependiente de la edad y únicamente se haya hecho la evaluación de una edad para ambos genotipos. A esta edad hemos analizado el fenotipo microglial en los animales APP y APP/IL4^{-/-}, observando una menor ramificación de las prolongaciones en la microglía localizada alrededor de las placas. Así, esta microglía muestra una apariencia más esférica en los animales APP/IL4^{-/-}.

El incremento en la carga amiloide observado en los APP/IL4^{-/-} puede deberse a que la delección de la IL-4 provoca que la microglía adquiera un fenotipo de activación proinflamatorio no fagocítico. Es la microglía con fenotipo antiinflamatorio la que se

relaciona con la fagocitosis del péptido amiloide. El fenotipo microglial M2 libera citoquinas antiinflamatorias como IL-4, IL-10 y TGF- β (Luzina y col., 2012; ver revisión Varnum e Ikezu, 2012; Latta y col., 2014). En concreto, los macrófagos M2a son activados por IL-4 (Van Dyken y Locksley, 2013), principalmente, y se encargan de la resolución de la inflamación y fagocitosis (Brown y Hural, 1997). Así, la microglía con este fenotipo es capaz de incorporar el A β (Frautschy y col., 1992; Kopec y Carroll, 1998), aunque la capacidad fagocítica de estas células está alterada con la progresión de la EA (Koenigsknecht-Talboo y Landreth, 2005).

Aquí hemos descrito que la eliminación de la expresión de IL-4 condujo a un incremento del fenotipo M1 microglial, con un aumento de la expresión de su marcador clásico, TNF- α , e IL-6, igualmente característica del estadio clásico de activación microglial. Los estímulos proinflamatorios, incluyendo la producción de citoquinas como IL-1 β , IL-6 o IFN- γ , exacerbaban la neuropatología de la EA al incrementar el procesamiento amiloidogénico del APP y promover la acumulación de A β en el cerebro, apoyando así el incremento en la carga amiloide descrito en los animales APP/IL4^{-/-}.

El hecho de que las diferencias en la expresión de marcadores proinflamatorios del fenotipo microglial M1 entre los grupos experimentales (APP y APP/IL4^{-/-}) sean solo significativas a edades tempranas, puede deberse al hecho de que, durante el proceso de envejecimiento y en la EA, la microglía cambia de un fenotipo M2 antiinflamatorio a uno M1 proinflamatorio (ver revisión Varnum e Ikezu, 2012). Este cambio también se ha descrito en modelos transgénicos de la EA (Jimenez y col., 2008). Por lo tanto, el incremento de expresión de marcadores proinflamatorios en los animales APP con la edad puede hacer que se diluyan las diferencias con respecto a los APP/IL4^{-/-}.

En concordancia con nuestros resultados, la sobreexpresión de otra citoquina antiinflamatoria, la IL-10, reduce la microgliosis y la astrogliosis, mejorando la cognición en un modelo PS1/APP de la EA, aunque sin reducción de la amiloidosis (Kiyota y col., 2012). Esta ausencia de efecto sobre la carga amiloide puede deberse a que es la microglía M2a, activada por IL-4, la responsable de la fagocitosis del A β , mientras que la microglía M2c, inducida por IL-10, puede jugar más una función de apoyo (ver revisión Cherry y col., 2014). Así, el tratamiento de cultivos microgliales M2 de rata con IL-4 incrementa la incorporación y degradación de A β oligomérico, al inducir la expresión del receptor CD36 y las enzimas neprelisina y degradadora de insulina (Shimizu y col., 2008). Asimismo, la sobreexpresión de IL-4 en el hipocampo de ratones transgénicos de la EA (PS1/APP y APP23) conduce a una mitigación de la patología de A β y la activación glial (Szczepanik y col., 2001; Lyons y col., 2007), mejorando la cognición e incrementando la neurogénesis (Kiyota y col., 2010; Kawahara y col., 2012). Por otro lado, la inmunización subcutánea con IL-4 resultó en un estímulo de anticuerpos contra A β y un descenso en la carga amiloide en el cerebro, demostrando que IL-4 promueve la eliminación del A β (DaSilva y

col., 2006; Frazer y col., 2008). Tanto IL-10 como IL-4 revirtieron los déficits inducidos por LPS en la LTP en rata (Lynch y col., 2004; Nolan y col., 2005) y el tratamiento con IL-4 bloqueó la inhibición, inducida por LPS, de la fagocitosis del A β (Koenigsknecht-Talboo y Landreth, 2005). Este efecto también se extiende a la degradación del A β internalizado, ya que el tratamiento con IL-4 puede disminuir el pH de los fagosomas y lisosomas y permitir, así, una degradación más eficiente del A β (Majumdar y col., 2007; Balce y col., 2011). Además de incrementar la fagocitosis, IL-4 es capaz de aumentar la expresión de neprelisina (Kawahara y col., 2012). Por último, nuestros resultados se encuentran apoyados por el hecho de que el tratamiento con IL-4 se ha ensayado en ratones modelo de encefalitis (Shay y col., 1997; Furlan y col., 1998; Butti y col., 2008) obteniéndose resultados positivos.

Por ello, la potenciación del fenotipo microglial M2 puede ser beneficiosa en modelos preclínicos de la EA y se ha propuesto que la manipulación específica de factores de señalización asociados con un cambio hacia el fenotipo M2 microglial como estrategia terapéutica. En este sentido, un estudio reciente ha propuesto un papel importante del inflammasoma NLRP3, un complejo multiproteico que consta de caspasa 1, PYCARD, NALP y caspasa 5. Los ratones PS1/APP *knockout* para este complejo recuperan la memoria espacial, la plasticidad sináptica y reducen la carga amiloide. Estos cambios están asociados con un incremento en la actividad fagocítica microglial y en la expresión de la enzima degradadora de insulina. Estos animales muestran un incremento en el fenotipo M2 microglial con la expresión de FIZZ1, Arginasa-1 e IL-4 (Heneka y col., 2013).

Sin embargo, nuestro trabajo discrepa con los resultados obtenidos por otros grupos de investigación que muestran que una terapia antiinflamatoria no siempre es favorable, ya que la expresión de IL-4 o IL-10 empeoró la patología amiloide (Chakrabarty y col., 2012), proponiendo que los estímulos antiinflamatorios promueven la deposición amiloide. Estos autores muestran que la sobreexpresión de IL-4 en dos modelos transgénicos de APP conlleva el establecimiento de un fenotipo microglial M2 acompañado de una exacerbación de la deposición amiloide, posiblemente debido a la supresión de los mecanismos de eliminación del péptido a través de la fagocitosis glial (Chakrabarty y col., 2012). En línea con estos resultados, dos publicaciones recientes han mostrado que la citoquina antiinflamatoria IL-10 inhibe la eliminación de A β por la microglía, empeorando el declive cognitivo en modelos animales de la EA (Chakrabarty y col., 2015; Guillot-Sestier y col., 2015). En estos estudios, Chakrabarty y col. (2015), sobreexpresaron IL-10 en dos modelos transgénicos de la EA (TgCRND8 y Tg2576), lo que conllevó a un incremento en la concentración de A β y el número de placas. Por su parte, Guillot-Sestier y col. (2015), provocaron la delección genética de IL-10 en un modelo PS1/APP conduciendo a una reducción en la carga amiloide y un rescate de la función cognitiva.

No está claro por qué sus resultados son diferentes de otros obtenidos *in vivo* e *in vitro*. La falta de concordancia entre estos resultados y los nuestros indica que es crucial un conocimiento más profundo de cómo y cuándo manipular la respuesta inmune para obtener resultados favorables (Heppner y col., 2015), mostrando la complejidad de la naturaleza de la activación microglial (ver revisión Cherry y col., 2014).

La astrogliá reactiva, al igual que la microglía activada, tiende a localizarse también alrededor de las placas amiloides. En cerebros de la EA, se han encontrado fragmentos de A β en la microglía activada y los astrocitos reactivos, proporcionando pruebas de la degradación fagocítica del A β (Akiyama y col., 1996; Funato y col., 1998). Aquí, no hemos detectado ningún efecto aparente de la delección de IL-4 sobre la astrogliá, ya que, aparentemente, los astrocitos muestran la misma morfología y grado de inmunorreactividad para GFAP en los animales APP y APP/IL4^{-/-}. Se ha propuesto que IL-4 y otras citoquinas antiinflamatorias pueden afectar a la astrogliosis y modular la respuesta astrocítica frente a un daño en el SNC (Balasingam y Young, 1996). Sin embargo, IL-4 puede que no sea muy efectiva modulando el fenotipo neuroprotector de astrocitos (Garg y col., 2009).

Es posible que el descenso en la complejidad de las prolongaciones microgliales asociadas con las placas de A β sea un factor importante en la mayor vulnerabilidad (Baron y col., 2014) observada en los animales APP/IL4^{-/-}. La menor ramificación de las prolongaciones microgliales en los animales APP/IL4^{-/-} de 12 meses de edad (mayor índice de esfericidad) puede conllevar a una mayor área de placa desnuda de prolongaciones microgliales y por tanto una mayor exposición del anillo de Abeta oligomérico periférico de la placa con el parénquima cerebral. Este contacto directo de la placa con el parénquima, por disminución de la barrera microglial, podría producir un efecto perjudicial sobre los axones/terminales presinápticos cercanos a la placa, explicando el mayor número de distrofias observadas en estos animales a esta edad. Esto está en concordancia con lo descrito por Condello y col. (2015), quienes han propuesto que las áreas de las placas no cubiertas por la microglía son menos compactas y están asociadas con una distrofia axonal más severa. Además de esta barrera celular física, la fagocitosis activa de A β oligomérico por la microglía (Frautschy y col., 1992; Weldon y col., 1998; Mandrekar y col., 2009; Liu y col., 2010) y la actividad proteolítica de las enzimas secretadas por ésta (Yang y col., 2011), podrían reducir la polimerización local y evitar la extensión fibrilar del A β , impidiendo que la placa aumentase de tamaño (Simard y col., 2006; Bolmont y col., 2008; Condello y col., 2015) y disminuyendo el daño axonal provocado por la deposición amiloide. De acuerdo con esta función microglial, hemos descrito un incremento en la patología distrófica en los animales APP/IL4^{-/-} con respecto a los APP, que puede deberse a la mayor deposición amiloide (carga amiloide) y la mayor cantidad de A β oligomérico presenten en los animales APP/IL4^{-/-}.

En relación con la patología axonal, parece que la ausencia de IL-4 aumenta la vulnerabilidad a la neuroinflamación o a la deposición amiloide. En este sentido, se ha propuesto que IL-4 parece prevenir el daño celular, ya que cultivos de células ganglionares de retina incubados con IL-4 muestran un incremento de hasta 2 veces en la supervivencia (Sholl-Franco y col., 2001). En este trabajo no hemos determinado si la delección de la IL-4 en este modelo APP conlleva un proceso neurodegenerativo sobre determinadas poblaciones neuronales, algo que sería necesario averiguar en un futuro. De hecho, se ha planteado que la microglía estimulada por IL-4 provoca un descenso en la producción de la citoquina citotóxica TNF- α y un incremento en la secreción del factor neuroprotector IGF-1, induciendo neurogénesis *in vitro* (Butovsky y col., 2005; 2006).

Se ha propuesto que la neuroinflamación podría explicar el déficit en la formación de la memoria en pacientes de la EA (ver revisión Varnum e Ikezu, 2012). El envejecimiento en humanos y roedores va acompañado por un declive cognitivo, al que contribuye un incremento en el proceso inflamatorio. Las citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 e IL-8 se encuentran incrementadas en el hipocampo de animales envejecidos y afectan a la LTP. Dado el incremento en el proceso inflamatorio en los animales APP/IL4^{-/-} con respecto a los APP (aumento en la expresión de Iba1, CD45, IL-6 y TNF- α), sería interesante determinar si la delección de IL-4 provoca un mayor déficit cognitivo. El modelo APP muestra déficits a partir de los 6 meses de edad (Faizi y col., 2012). En este momento nos encontramos realizando estudios de comportamiento en estos animales, ya que podría ser que el incremento en la deposición amiloide observado en los APP/IL4^{-/-} conduzca a un aumento en la toxicidad sináptica y daño en la memoria. Los resultados preliminares en un número pequeño de animales indican una disminución de la capacidad cognitiva, medida mediante la prueba de reconocimiento de objetos, en los animales APP/IL4^{-/-}.

En este sentido, se ha mostrado que durante el envejecimiento se produce un descenso en los niveles de IL-4 (Maher y col., 2005). La administración intracerebroventricular de IL-4 rescata los déficits en la LTP observado en animales viejos (Nolan y col., 2005). El efecto de IL-4 sobre la cognición se ha mostrado también en ratones *knockout* para IL-4 en los que se observan déficits severos en el aprendizaje (Derecki y col., 2010). Los efectos beneficiosos de IL-4 sobre la función cognitiva se deben a que esta citoquina antagoniza los efectos deletéreos de las citoquinas proinflamatorias (IL-1 β y TNF- α ejercen un efecto negativo sobre la cognición; Dantzer y col., 2008) y provoca un incremento en la producción de BDNF por los astrocitos (Derecki y col., 2010).

Resultados similares a los descritos en este trabajo, se han obtenido en nuestro grupo de investigación con un tratamiento de inmunosupresión con ciclosporina y prednisona en un modelo PS1/APP. Este tratamiento se ha aplicado cuando la microglía exhibe un

fenotipo antiinflamatorio neuroprotector en este modelo, resultando en una agravación de la patología, con un incremento en la carga amiloide y del proceso neurodegenerativo (datos no publicados). Por tanto, las futuras estrategias terapéuticas para la enfermedad de Alzheimer centradas en la respuesta inflamatoria no deben ir encaminadas a una supresión de la respuesta inmune, sino a una modulación de la microglía hacia un fenotipo neuroprotector. Así, la glía podría ser una interesante diana celular para potenciales tratamientos de la EA, que debe estudiarse con mayor profundidad. En este sentido, se ha usado la modulación de la inflamación en diferentes modelos animales de la EA para conocer la implicación de ésta en la patogénesis de la enfermedad (para revisión ver Birch y col., 2014).

Como se ha comentado con anterioridad, la microglía cambia de un fenotipo de activación M2 a uno M1 durante la progresión de la EA (Jimenez y col., 2008; Fig. 3.5.20).

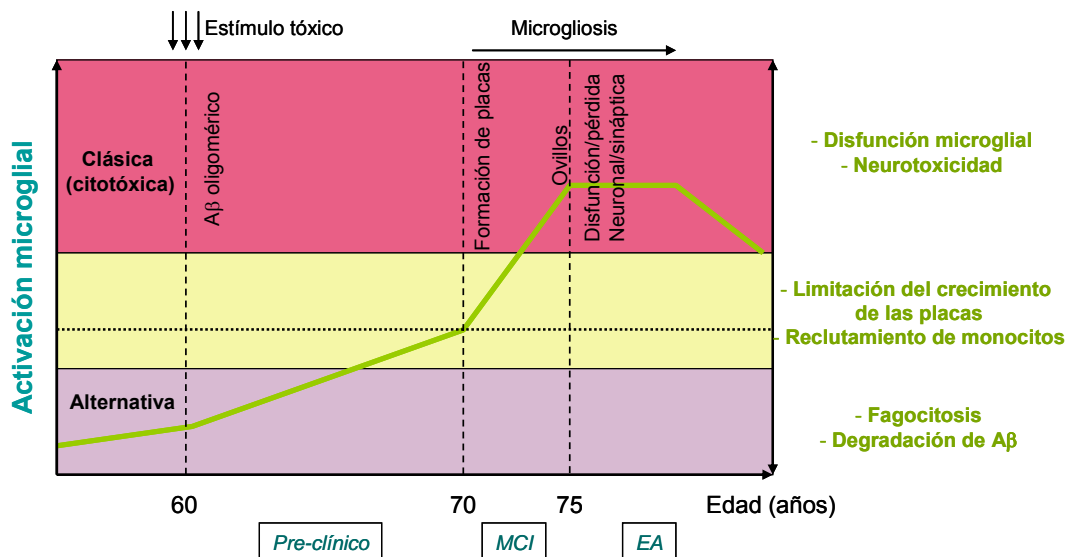


Figura 3.5.20. La activación microglial conlleva efectos beneficiosos y perjudiciales a lo largo de la EA. En un cerebro sano la microglía contribuye a la homeostasis del mismo mediante un proceso de fagocitosis. Con el desarrollo de los síntomas de la enfermedad de Alzheimer, la microglía se activa por el A β conduciendo a un proceso inflamatorio crónico, en un principio previniendo la formación de placas y restringiendo su crecimiento y, posteriormente, contribuyendo a la disfunción sináptica y neurítica. El cambio en el fenotipo de activación microglial ha sido descrito tanto en modelos animales de la EA como en humanos. MCI: del inglés “*mild cognitive impairment*”. (Modificado de Shlachetzki y Hüll, 2009).

Por tanto, el uso de fármacos antiinflamatorios, deberá tener en cuenta el perfil M1 o M2 de activación, sugiriendo que el tratamiento no debe suprimir la respuesta inmune sino modular los perfiles hacia el más beneficioso (Latta y col., 2014). Esto puede explicar por qué a pesar de la relación epidemiológica entre el uso de antiinflamatorios no esteroideos y la reducción en el riesgo de desarrollar la EA, los ensayos clínicos han fracasado (Aisen, 2002; Chiang y Koo, 2014; Heppner y col., 2015). Una de las drogas antiinflamatorias, MV-151, se ha desarrollado para atenuar la respuesta tipo M1. El tratamiento con este compuesto en un modelo transgénico de la EA reduce el daño en la LTP (Bachsetter y col., 2012). Otro compuesto similar es VP025 reduce el incremento en la expresión de

citoquinas proinflamatorias inducido por la edad y LPS e incrementa la expresión de CD200 restaurando la LTP en ratas (Martin y col., 2009). Aquí proponemos que un tratamiento más eficaz debería conducir el perfil inmune hacia el M2a, que podría ser potenciado por la liberación de IL-4. En modelos transgénicos de la EA, el tratamiento con IL-4 induce un perfil M2 e incrementa la eliminación microglial de A β (Lyons y col., 2007; Shimizu y col., 2008; Varnum e Ikezu, 2012). De hecho, el incremento en la producción de IL-4 podría ser responsable, parcialmente, del efecto terapéutico de los inhibidores de acetilcolinesterasa, ya que los pacientes tratados con éstos muestran un incremento en la producción de IL-4 (Lugaresi y col., 2004).

Por ello, el tratamiento con IL-4 puede revertir ciertos aspectos de la patología de la EA en modelos animales. En este sentido, y para complementar los resultados aquí expuestos, sería necesario estudiar el efecto de la sobre-expresión de IL-4 en el modelo APP. Así, una nueva estrategia terapéutica para la EA es el uso de agentes que estimulen la producción de IL-4 en el SNC o la modulación de la respuesta neuroinflamatoria hacia un fenotipo M2 microglial (Fig. 3.5.21).

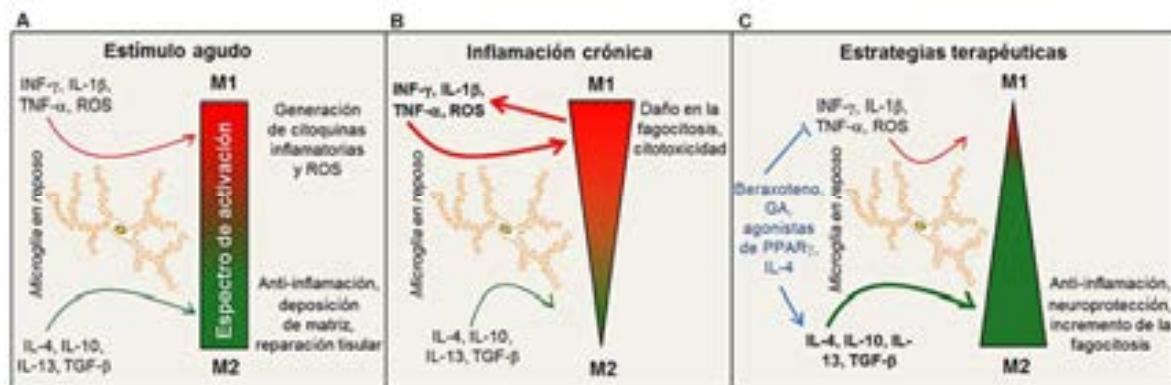


Figura 3.5.21. Modelo de acción de las estrategias terapéuticas centradas en la polarización microglial. A). Una gran variedad de citoquinas son capaces de polarizar la microglía hacia un fenotipo de activación microglial: M1 (proinflamatorio) o M2 (antiinflamatorio). B) Tras una inflamación prolongada o crónica, una sobreproducción de citoquinas inflamatorias desvía la microglía hacia el fenotipo M1. La microglía M1 produce citoquinas inflamatorias adicionales, generando un círculo vicioso que mantiene el estado de activación microglial M1. Esta población microglial M1 muestra daño en la fagocitosis y actividad citotóxica. C) Para tratar las enfermedades neuroinflamatorias como la EA, ciertos agentes terapéuticos, tales como GA (del inglés *glatiramer acetate*), el beraxoteno, los agonistas de PPAR γ o la IL-4, muestran la capacidad de inhibir la inflamación así como de inducir una activación M2, resultando en una reducción de la severidad de la enfermedad (Modificado de Cherry y col., 2014).

Por tanto, el concepto clásico de respuesta microglial citotóxica asociada a la patología neurodegenerativa debe ser reevaluado. Además, un problema añadido a la búsqueda de terapias es que los modelos actuales de la EA (sobre todo aquellos basados en la sobreexpresión de A β) no mimetizan la respuesta microglial observada en los pacientes (datos no publicados del grupo de investigación). Mientras que en los modelos animales la microglía se activa progresivamente con el desarrollo de la patología, en los pacientes parece tener lugar un proceso degenerativo de esta población celular. Esta disfunción

microglial en los pacientes puede ser una posible explicación al fracaso traslacional de los datos preclínicos obtenidos con terapias antiinflamatorias, ya que la respuesta microglial en humanos y modelos es diferente. Esta idea se ve apoyada por el hecho de que la disfunción microglial en los modelos animales, inducida por sobreactivación (resultados obtenidos en esta Tesis doctoral con el modelo APP/IL4^{-/-}) o por inmunosupresión (resultados no publicados del grupo de investigación), produce un agravamiento de la patología en los modelos.

CONCLUSIÓN

La delección de IL-4 acelera la progresión de la enfermedad en el hipocampo del modelo APP, provocando un incremento en la patología amiloide y axonal. Este incremento en la carga amiloide puede deberse a un cambio en la población microglial hacia un fenotipo proinflamatorio no fagocítico. No hay pruebas de que el efecto proamiloidogénico sea debido a una alteración en el procesamiento de APP. La modulación de la respuesta inflamatoria, y en concreto la polarización de la microglía hacia un fenotipo de activación M2, mediado por IL-4, puede ser considerado como una potencial estrategia terapéutica.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas N, Bednar I, Mix E, Marie S, Paterson D, Ljungberg A, Morris C, Winblad B, Nordberg A, Zhu J.** (2002). Up-regulation of the inflammatory cytokines IFN-gamma and IL-12 and down-regulation of IL-4 in cerebral cortex regions of APP(SWE) transgenic mice. *J Neuroimmunol.*, 126(1-2):50-57.
- Ahmed Z, Shaw G, Sharma VP, Yang C, McGowan E, Dickson DW.** (2007). Actin-binding proteins coronin-1a and IBA-1 are effective microglial markers for immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem.*, 55(7):687-700.
- Aisen PS.** (2002). The potential of anti-inflammatory drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.*, 1(5):279-284.
- Akiyama H, Schwab C, Kondo H, Mori H, Kametani F, Ikeda K, McGeer PL.** (1996). Granules in glial cells of patients with Alzheimer's disease are immunopositive for C-terminal sequences of beta-amyloid protein. *Neurosci Lett.*, 206(2-3):169-172.
- Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautsch S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyama I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T.** (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 21(3):383-421.
- Bachstetter AD, Norris CM, Sompol P, Wilcock DM, Goulding D, Neltner JH, St Clair D, Watterson DM, Van Eldik LJ.** (2012). Early stage drug treatment that normalizes proinflammatory cytokine production attenuates synaptic dysfunction in a mouse model that exhibits age-dependent progression of Alzheimer's disease-related pathology. *J Neurosci.*, 32(30):10201-10210.
- Balasingam V, Yong VW.** (1996). Attenuation of astroglial reactivity by interleukin-10. *J Neurosci.*, 16(9):2945-2955.
- Balce DR, Li B, Allan ER, Rybicka JM, Krohn RM, Yates RM.** (2011). Alternative activation of macrophages by IL-4 enhances the cytolytic capacity of their phagosomes through synergistic mechanisms. *Blood*, 118(15):4199-4208.
- Bales KR, Verina T, Cummins DJ, Du Y, Dodel RC, Saura J, Fishman CE, DeLong CA, Piccardo P, Petegnief V, Ghetti B, Paul SM.** (1999). Apolipoprotein E is essential for amyloid deposition in the APP(V717F) transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(26):15233-15238.

- Bell KF, Claudio Cuello A.** (2006). Altered synaptic function in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol.*, 545(1):11-21.
- Birch AM, Katsouri L, Sastre M.** (2014). Modulation of inflammation in transgenic models of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*, 11:25.
- Boutajangout A, Authelet M, Blanchard V, Touchet N, Tremp G, Pradier L, Brion JP.** (2004). Characterisation of cytoskeletal abnormalities in mice transgenic wild-type human tau an familial Alzheimer's disease mutants of APP and presenilin-1. *Neurobiol Dis.*, 15(19):47-60.
- Bradshaw EM, Chibnik LB, Keenan BT, Ottoboni L, Raj T, Tang A, Rosenkrantz LL, Imboywa S, Lee M, Von Korff A; Alzheimer Disease Neuroimaging Initiative, Morris MC, Evans DA, Johnson K, Sperling RA, Schneider JA, Bennett DA, De Jager PL.** (2013). CD33 Alzheimer's disease locus: altered monocyte function and amyloid biology. *Nat Neurosci.*, 16(7):848-850.
- Brosseron F, Krauthausen M, Kummer M, Heneka MT.** (2014). Body fluid cytokine levels in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: a comparative overview. *Mol Neurobiol.*, 50(2):534-44.
- Brown MA, Hural J.** (1997). Functions of IL-4 and control of its expression. *Crit Rev Immunol.*, 17(1):1-32.
- Burda JE, Sofroniew MV.** (2014). Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron*, 81(2):229-248.
- Butovsky O, Talpalar AE, Ben-Yaakov K, Schwartz M.** (2005). Activation of microglia by aggregated beta-amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN-gamma and IL-4 render them protective. *Mol Cell Neurosci.*, 29(3):381-393.
- Butovsky O, Koronyo-Hamaoui M, Kunis G, Ophir E, Landa G, Cohen H, Schwartz M.** (2006). Glatiramer acetate fights against Alzheimer's disease by inducing dendritic-like microglia expressing insulin-like growth factor 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(31):11784-11789.
- Butti E, Bergami A, Recchia A, Brambilla E, Del Carro U, Amadio S, Cattalini A, Esposito M, Stornaiuolo A, Comi G, Pluchino S, Mavilio F, Martino G, Furlan R.** (2008). IL4 gene delivery to the CNS recruits regulatory T cells and induces clinical recovery in mouse models of multiple sclerosis. *Gene Ther.*, 15(7):504-515.
- Cao C, Arendash GW, Dickson A, Mamcarz MB, Lin X, Ethell DW.** (2009). Abeta-specific Th2 cells provide cognitive and pathological benefits to Alzheimer's mice without infiltrating the CNS. *Neurobiol Dis.*, 34(1):63-70.
- Chakrabarty P, Tianbai L, Herring A, Ceballos-Diaz C, Das P, Golde TE.** (2012). Hippocampal expression of murine IL-4 results in exacerbation of amyloid deposition. *Mol Neurodegener.*, 7:36.
- Chakrabarty P, Li A, Ceballos-Diaz C, Eddy JA, Funk CC, Moore B, DiNunno N, Rosario AM, Cruz PE, Verbeeck C, Sacino A, Nix S, Janus C, Price ND, Das P, Golde TE.** (2015). IL-10 alters immunoproteostasis in APP mice, increasing plaque burden and worsening cognitive behavior. *Neuron*, 85(3):519-533.
- Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion MK.** (2014). Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation*, 11:98.
- Chiang K, Koo EH.** (2014). Emerging therapeutics for Alzheimer's disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 54:381-405.
- Clarke RM, Lyons A, O'Connell F, Deighan BF, Barry CE, Anyakoha NG, Nicolaou A, Lynch MA.** (2008). A pivotal role for interleukin-4 in atorvastatin-associated neuroprotection in rat brain. *J Biol Chem.*, 283(4):1808-1817.
- Condello C, Yuan P, Schain A, Grutzendler J.** (2015). Microglia constitute a barrier that prevents neurotoxic protofibrillar A β 42 hotspots around plaques. *Nat Commun.*, 6:6176.
- Craft JM, Watterson DM, Van Eldik LJ.** (2006). Human amyloid beta-induced neuroinflammation is an early event in neurodegeneration. *Glia*, 53(5):484-490.
- Cras P, Kawai M, Lowery D, Gonzalez-DeWhitt P, Greenberg B, Perry G.** (1991). Senile plaque neurites in Alzheimer disease accumulate amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(17):7552-7556.
- DaSilva K, Brown ME, Westaway D, McLaurin J.** (2006). Immunization with amyloid-beta using GM-CSF and IL-4 reduces amyloid burden and alters plaque morphology. *Neurobiol Dis.*, 23(2):433-444.
- Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW.** (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci.*, 9(1):46-56.
- Derecki NC, Cardani AN, Yang CH, Quinnes KM, Crihfield A, Lynch KR, Kipnis J.** (2010). Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4. *J Exp Med.*, 207(5):1067-1080.
- Dickson TC, King CE, McCormack G, Vickers JC.** (1999). Neurochemical diversity of the dystrophic neurites in the early and late stages of Alzheimer's disease. *Exp Neurol.*, 156:100-110.
- Du Yan S, Zhu H, Fu J, Yan SF, Roher A, Tourtellotte WW, Rajavashisth T, Chen X, Godman GC, Stern D, Schmidt AM.** (1997). Amyloid-beta peptide-receptor for advanced glycation endproduct interaction elicits neuronal expression of macrophage-colony stimulating

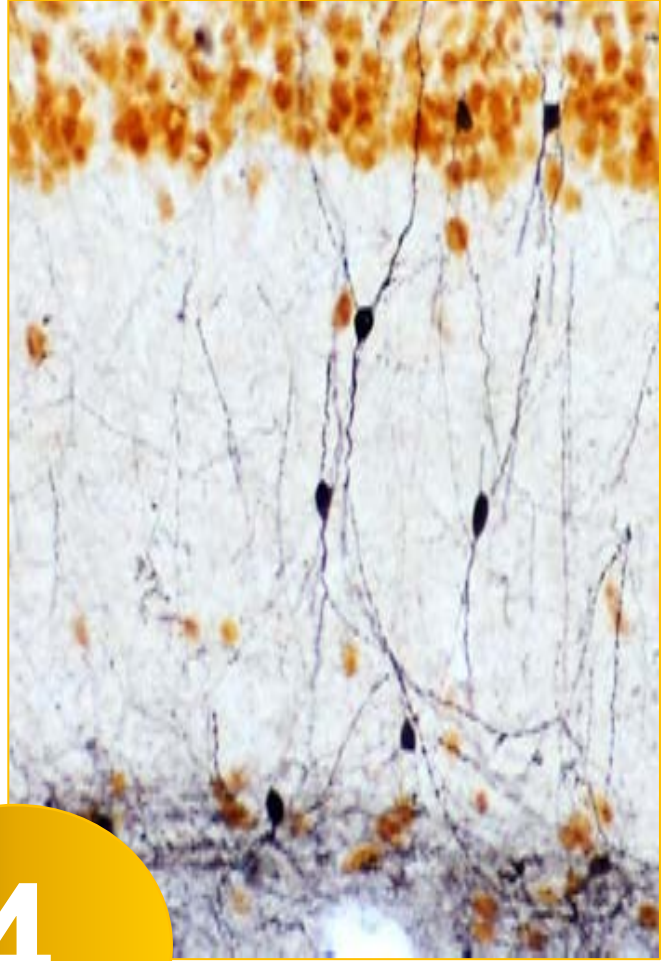
- factor: a proinflammatory pathway in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(10):5296-5301.
- Edison P, Archer HA, Gerhard A, Hinz R, Pavese N, Turkheimer FE, Hammers A, Tai YF, Fox N, Kennedy A, Rossor M, Brooks DJ.** (2008). Microglia, amyloid, and cognition in Alzheimer's disease: An [11C](R)PK11195-PET and [11C]PIB-PET study. *NeurobiolDis.*, 32(3):412-419.
- El Khoury J, Hickman SE, Thomas CA, Cao L, Silverstein SC, Loike JD.** (1996). Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature*, 382(6593):716-719.
- Fagan AM, Perrin RJ.** (2012). Upcoming candidate cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease. *Biomark Med.*, 6(4):455-476.
- Faizi M, Bader PL, Saw N, Nguyen TV, Beraki S, Wyss-Coray T, Longo FM, Shamloo M.** (2012). Thy1-hAPP(Lond/Swe+) mouse model of Alzheimer's disease displays broad behavioral deficits in sensorimotor, cognitive and social function. *Brain Behav.*, 2(2):142-154.
- Fassbender K, Walter S, Kühl S, Landmann R, Ishii K, Bertsch T, Stalder AK, Muehlhauser F, Liu Y, Ulmer AJ, Rivest S, Lentschat A, Gulbins E, Jucker M, Staufenbiel M, Brechtel K, Walter J, Multhaup G, Penke B, Adachi Y, Hartmann T, Beyreuther K.** (2004). The LPS receptor (CD14) links innate immunity with Alzheimer's disease. *FASEB J.*, 18(1):203-205.
- Frautschy SA, Cole GM, Baird A.** (1992). Phagocytosis and deposition of vascular beta-amyloid in rat brains injected with Alzheimer beta-amyloid. *Am J Pathol.*, 140(6):1389-1399.
- Frazer ME, Hughes JE, Mastrangelo MA, Tibbens JL, Federoff HJ, Bowers WJ.** (2008). Reduced pathology and improved behavioral performance in Alzheimer's disease mice vaccinated with HSV amplicons expressing amyloid-beta and interleukin-4. *Mol Ther.*, 16(5):845-853.
- Frenkel D, Wilkinson K, Zhao L, Hickman SE, Means TK, Puckett L, Farfara D, Kingery ND, Weiner HL, El Khoury J.** (2013). Scaral deficiency impairs clearance of soluble amyloid- β by mononuclear phagocytes and accelerates Alzheimer's-like disease progression. *Nat Commun.*, 4:2030.
- Funato H, Yoshimura M, Yamazaki T, Saido TC, Ito Y, Yokofujita J, Okeda R, Ihara Y.** (1998). Astrocytes containing amyloid beta-protein (A β)-positive granules are associated with A β 40-positive diffuse plaques in the aged human brain. *Am J Pathol.*, 152(4):983-992.
- Furlan R, Poliani PL, Galbiati F, Bergami A, Grimaldi LM, Comi G, Adorini L, Martino G.** (1998). Central nervous system delivery of interleukin 4 by a nonreplicative herpes simplex type 1 viral vector ameliorates autoimmune demyelination. *Hum Gene Ther.*, 9(17):2605-2617.
- Gadani SP, Cronk JC, Norris GT, Kipnis J.** (2012). IL-4 in the brain: a cytokine to remember. *J Immunol.*, 189(9):4213-4219.
- Garg SK, Kipnis J, Banerjee R.** (2009). IFN-gamma and IL-4 differentially shape metabolic responses and neuroprotective phenotype of astrocytes. *J Neurochem.*, 108(5):1155-1166.
- Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, Carrasquillo M, Rogaeva E, Majounie E, Cruchaga C, Sassi C, Kauwe JS, Younkin S, Hazrati L, Collinge J, Pockock J, Lashley T, Williams J, Lambert JC, Amouyel P, Goate A, Rademakers R, Morgan K, Powell J, St George-Hyslop P, Singleton A, Hardy J; Alzheimer Genetic Analysis Group.** (2013). TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N Engl J Med.*, 368(2):117-127.
- Guillot-Sestier MV, Doty KR, Gate D, Rodriguez J Jr, Leung BP, Rezai-Zadeh K, Town T.** (2015). IL10 deficiency rebalances innate immunity to mitigate Alzheimer-like pathology. *Neuron*, 85(3):534-548.
- Hart PH, Vitti GF, Burgess DR, Whitty GA, Piccoli DS, Hamilton JA.** (1989). Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86(10):3803-3807.
- Heneka MT, O'Banion MK.** (2007). Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol.*, 184(1-2):69-91.
- Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, Delekate A, Schwartz S, Vieira-Saecker A, Griep A, Axt D, Remus A, Tzeng TC, Gelpi E, Halle A, Korte M, Latz E, Golenbock DT.** (2013). NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature*, 493(7434):674-678.
- Heneka MT, Kummer MP, Latz E.** (2014). Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol.*, 14(7):463-477.
- Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, Jacobs AH, Wyss-Coray T, Vitorica J, Ransohoff RM, Herrup K, Frautschy SA, Finsen B, Brown GC, Verkhratsky A, Yamanaka K, Koistinaho J, Latz E, Halle A, Petzold GC, Town T, Morgan D, Shinohara ML, Perry VH, Holmes C, Bazan NG, Brooks DJ, Hunot S, Joseph B, Deigendesch N, Garaschuk O, Boddeke E, Dinarello CA, Breitner JC, Cole GM, Golenbock DT, Kummer MP.** (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.*, 14(4):388-405.
- Heppner FL, Roth K, Nitsch R, Hailer NP.** (1998). Vitamin E induces ramification and downregulation of adhesion molecules in cultured microglial cells. *Glia*, 22(2):180-188.
- Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B.** (2015). Immune attack: the role of inflammation in

- Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci.*, 16(6):358-372.
- Hickman SE, Allison EK, El Khoury J.** (2008). Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J Neurosci.*, 28(33):8354-8360.
- Iribarren P, Chen K, Hu J, Zhang X, Gong W, Wang JM.** (2005). IL-4 inhibits the expression of mouse formyl peptide receptor 2, a receptor for amyloid beta1-42, in TNF-alpha-activated microglia. *J Immunol.*, 175(9):6100-6106.
- Jimenez S, Baglietto-Vargas D, Caballero C, Moreno-Gonzalez I, Torres M, Sanchez-Varo R, Ruano D, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J.** (2008). Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *J Neurosci.*, 28(45):11650-11661.
- Jonsson T, Stefansson H, Steinberg S, Jonsdottir I, Jonsson PV, Snaedal J, Bjornsson S, Huttenlocher J, Levey AI, Lah JJ, Rujescu D, Hampel H, Giegling I, Andreassen OA, Engedal K, Ulstein I, Djurovic S, Ibrahim-Verbaas C, Hofman A, Ikram MA, van Duijn CM, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K.** (2013). Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med.*, 368(2):107-116.
- Kawahara K, Suenobu M, Yoshida A, Koga K, Hyodo A, Ohtsuka H, Kuniyasu A, Tamamaki N, Sugimoto Y, Nakayama H.** (2012). Intracerebral microinjection of interleukin-4/interleukin-13 reduces β -amyloid accumulation in the ipsilateral side and improves cognitive deficits in young amyloid precursor protein 23 mice. *Neuroscience*, 207:243-260.
- Kelley KW, Bluthé RM, Dantzer R, Zhou JH, Shen WH, Johnson RW, Broussard SR.** (2003). Cytokine-induced sickness behavior. *Brain Behav Immun.*, 17 Suppl 1:S112-8.
- Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG.** (2009). Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci.*, 29(43):13435-3444.
- Kitazawa M, Yamasaki TR, LaFerla FM.** (2004). Microglia as a potential bridge between the amyloid beta-peptide and tau. *Ann N Y Acad Sci.*, 1035:85-103.
- Kiyota T, Okuyama S, Swan RJ, Jacobsen MT, Gendelman HE, Ikezu T.** (2010). CNS expression of anti-inflammatory cytokine interleukin-4 attenuates Alzheimer's disease-like pathogenesis in APP+PS1 bigenic mice. *FASEB J.*, 24(8):3093-3102.
- Kiyota T, Ingraham KL, Swan RJ, Jacobsen MT, Andrews SJ, Ikezu T.** (2012). AAV serotype 2/1-mediated gene delivery of anti-inflammatory interleukin-10 enhances neurogenesis and cognitive function in APP+PS1 mice. *Gene Ther.*, 19(7):724-733.
- Koenigsknecht J, Landreth G.** (2004). Microglial phagocytosis of fibrillar beta-amyloid through a beta1 integrin-dependent mechanism. *J Neurosci.*, 24(44):9838-9846.
- Koenigsknecht-Talboo J, Landreth GE.** (2005). Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid and IgGs are differentially regulated by proinflammatory cytokines. *J Neurosci.*, 25(36):8240-8249.
- Koenigsknecht-Talboo J, Meyer-Luehmann M, Parsadanian M, Garcia-Alloza M, Finn MB, Hyman BT, Bacskai BJ, Holtzman DM.** (2008). Rapid microglial response around amyloid pathology after systemic anti-Abeta antibody administration in PDAPP mice. *J Neurosci.*, 28(52):14156-14164.
- Kopec KK, Carroll RT.** (1998). Alzheimer's beta-amyloid peptide 1-42 induces a phagocytic response in murine microglia. *J Neurochem.*, 71(5):2123-2131.
- Krabbe G, Halle A, Matyash V, Rinnenthal JL, Eom GD, Bernhardt U, Miller KR, Prokop S, Kettenmann H, Heppner FL.** (2013). Functional impairment of microglia coincides with Beta-amyloid deposition in mice with Alzheimer-like pathology. *PLoS One*, 8(4):e60921.
- Latta CH, Brothers HM, Wilcock DM.** (2014). Neuroinflammation in Alzheimer's disease; A source of heterogeneity and target for personalized therapy. *Neuroscience*.
- Lee CY, Landreth GE.** (2010). The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J Neural Transm.*, 117(8):949-960.
- Liu Z, Condello C, Schain A, Harb R, Grutzendler J.** (2010). CX3CR1 in microglia regulates brain amyloid deposition through selective protofibrillar amyloid- β phagocytosis. *J Neurosci.*, 30(50):17091-17101.
- Loane DJ, Deighan BF, Clarke RM, Griffin RJ, Lynch AM, Lynch MA.** (2009). Interleukin-4 mediates the neuroprotective effects of rosiglitazone in the aged brain. *Neurobiol Aging*, 30(6):920-931.
- Löffler T, Flunkert S, Havas D, Schweinzer C, Uger M, Windisch M, Steyrer E, Hutter-Paier B.** (2014). Neuroinflammation and related neuropathologies in APPSL mice: further value of this in vivo model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*, 11:84.
- Lowe J, Blanchard A, Morrell K, Lennox G, Reynolds L, Billett M, Landon M, Mayer RJ.** (1988). Ubiquitin is a common factor in intermediate filament inclusion bodies of diverse

- type in man, including those of Parkinson's disease, Pick's disease, and Alzheimer's disease, as well as Rosenthal fibres in cerebellar astrocytomas, cytoplasmic bodies in muscle, and mallory bodies in alcoholic liver disease. *J Pathol.*, 155(1):9-15.
- Lugaresi A, Di Iorio A, Iarlori C, Reale M, De Luca G, Sparvieri E, Michetti A, Conti P, Gambi D, Abate G, Paganelli R.** (2004). IL-4 in vitro production is upregulated in Alzheimer's disease patients treated with acetylcholinesterase inhibitors. *Exp Gerontol.*, 39(4):653-657.
- Lull ME, Levesque S, Surace MJ, Block ML.** (2011). Chronic apocynin treatment attenuates beta amyloid plaque size and microglial number in hAPP(751)(SL) mice. *PLoS One*, 6(5):e20153.
- Luzina IG, Keegan AD, Heller NM, Rook GA, Shea-Donohue T, Atamas SP.** (2012). Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of "alternatives". *J Leukoc Biol.*, 92(4):753-764.
- Lynch AM, Walsh C, Delaney A, Nolan Y, Campbell VA, Lynch MA.** (2004). Lipopolysaccharide-induced increase in signalling in hippocampus is abrogated by IL-10-a role for IL-1 beta? *JNeurochem.*,88(3):635-646.
- Lyons A, Griffin RJ, Costelloe CE, Clarke RM, Lynch MA.** (2007). IL-4 attenuates the neuroinflammation induced by amyloid-beta in vivo and in vitro. *J Neurochem.*, 101(3):771-781.
- Maher FO, Nolan Y, Lynch MA.** (2005). Downregulation of IL-4-induced signalling in hippocampus contributes to deficits in LTP in the aged rat. *Neurobiol Aging*, 26(5):717-728.
- Maher FO, Clarke RM, Kelly A, Nally RE, Lynch MA.** (2006). Interaction between interferon gamma and insulin-like growth factor-1 in hippocampus impacts on the ability of rats to sustain long-term potentiation. *J Neurochem.*, 96(6):1560-1571.
- Majumdar A, Cruz D, Asamoah N, Buxbaum A, Sohar I, Lobel P, Maxfield FR.** (2007). Activation of microglia acidifies lysosomes and leads to degradation of Alzheimer amyloid fibrils. *Mol Biol Cell.*, 18(4):1490-1496.
- Mandrekar S, Jiang Q, Lee CY, Koenigsknecht-Talboo J, Holtzman DM, Landreth GE.** (2009). Microglia mediate the clearance of soluble Abeta through fluid phase macropinocytosis. *J Neurosci.*, 29(13):4252-4262.
- Martin DS, Walsh M, Miller AM, Skerrett HE, Byrne P, Mandel A, Bolton AE, Lynch MA.** (2009). A novel phospholipid-based drug formulation, VP025, modulates age- and LPS-induced microglial activity in the rat. *Neuroimmunomodulation*, 16(6):400-410.
- McGeer PL, Itagaki S, Tago H, McGeer EG.** (1987). Reactive microglia in patients with senile dementia of the Alzheimer type are positive for the histocompatibility glycoprotein HLA-DR. *Neurosci Lett.*, 79(1-2):195-200.
- Medeiros R, LaFerla FM.** (2013). Astrocytes: conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. *Exp Neurol.*, 239:133-138.
- Michaud JP, Rivest S.** (2010). Anti-inflammatory signaling in microglia exacerbates Alzheimer's disease-related pathology. *Neuron*, 85(3):450-452.
- Mosher KI, Wyss-Coray T.** (2014). Microglial dysfunction in brain aging and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol.*, 88(4):594-604.
- Nagele RG, Wegiel J, Venkataraman V, Imaki H, Wang KC, Wegiel J.** (2004). Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 25(5):663-674.
- Noda-Saita K, Terai K, Iwai A, Tsukamoto M, Shitaka Y, Kawabata S, Okada M, Yamaguchi T.** (2004). Exclusive association and simultaneous appearance of congophilic plaques and AT8-positive dystrophic neurites in Tg2576 mice suggest a mechanism of senile plaque formation and progression of neuritic dystrophy in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*, 108:435-442.
- Nolan Y, Maher FO, Martin DS, Clarke RM, Brady MT, Bolton AE, Mills KH, Lynch MA.** (2005). Role of interleukin-4 in regulation of age-related inflammatory changes in the hippocampus. *J Biol Chem.*, 280(10):9354-9362.
- Núñez-Díaz C.** (2014). Estudio de la toxicidad de las placas amiloides durante la progresión de la patología en modelos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer. Trabajo Fin de Máster, Universidad de Málaga.
- Orre M, Kamphuis W, Osborn LM, Jansen AH, Kooijman L, Bossers K, Hol EM.** (2014). Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction. *Neurobiol Aging*, 35(12):2746-2760.
- Paresce DM, Ghosh RN, Maxfield FR.** (1996). Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor. *Neuron*, 17(3):553-565.
- Perez-Nievas BG, Stein TD, Tai HC, Dols-Icardo O, Scotton TC, Barroeta-Espar I, Fernandez-Carballo L, de Munain EL, Perez J, Marquie M, Serrano-Pozo A, Frosch MP, Lowe V, Parisi JE, Petersen RC, Ikonovic MD, López OL, Klunk W, Hyman BT, Gómez-Isla T.** (2013). Dissecting phenotypic traits linked to human resilience to Alzheimer's pathology. *Brain*, 136(Pt 8):2510-2526.
- Perry G, Friedman R, Shaw G, Chau V.** (1987). Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84(9):3033-3036.
- Ponomarev ED, Maresz K, Tan Y, Dittel BN.** (2007). CNS-derived interleukin-4 is essential

- for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cells. *J Neurosci.*, 27(40):10714-10721.
- Prinz M, Priller J.** (2014). Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci.*, 15(5):300-312.
- Prokop S, Miller KR, Heppner FL.** (2013). Microglia actions in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*, 126(4):461-477.
- Rockenstein E, Mallory M, Mante M, Sisk A, Masliah E.** (2001). Early formation of mature amyloid-beta protein deposits in a mutant APP transgenic model depends on levels of Abeta(1-42). *J Neurosci Res.*, 66(4):573-582.
- Rutten BP, Van der Kolk NM, Schafer S, van Zandvoort MA, Bayer TA, Steinbusch HW, Schmitz C.** (2005). Age-related loss of synaptophysin immunoreactive presynaptic boutons within the hippocampus of APP751SL, PS1M146L, and APP751SL/PS1M146L transgenic mice. *Am J Pathol.*, 167(1):161-173.
- Sanchez-Varo R, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, De Castro V, Jimenez S, Ruano D, Vizuete M, Davila JC, Garcia-Verdugo JM, Jimenez AJ, Vitorica J, Gutierrez A.** (2012). Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer's mice hippocampus. *Acta Neuropathol.*, 123(1):53-70.
- Sastre M, Klockgether T, Heneka MT.** (2006). Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *Int J Dev Neurosci.*, 24(2-3):167-176.
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ.** (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med.*, 14(8):837-842.
- Shaw MK, Lorens JB, Dhawan A, DalCanto R, Tse HY, Tran AB, Bonpane C, Eswaran SL, Brocke S, Sarvetnick N, Steinman L, Nolan GP, Fathman CG.** (1997). Local delivery of interleukin 4 by retrovirus-transduced T lymphocytes ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.*, 185(9):1711-1714.
- Sheedy FJ, Grebe A, Rayner KJ, Kalantari P, Ramkhalawon B, Carpenter SB, Becker CE, Ediriweera HN, Mullick AE, Golenbock DT, Stuart LM, Latz E, Fitzgerald KA, Moore KJ.** (2013). CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nat Immunol.*, 14(8):812-820.
- Shimizu E, Kawahara K, Kajizono M, Sawada M, Nakayama H.** (2008). IL-4-induced selective clearance of oligomeric beta-amyloid peptide(1-42) by rat primary type 2 microglia. *J Immunol.*, 181(9):6503-6513.
- Sholl-Franco A, Figueiredo KG, de Araujo EG.** (2001). Interleukin-2 and interleukin-4 increase the survival of retinal ganglion cells in culture. *Neuroreport.*, 12(1):109-112.
- Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S.** (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med.*, 176(1):287-292.
- Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, van Gils JM, Deng J, Halle A, Rayner KJ, Boyer L, Zhong R, Frazier WA, Lacy-Hulbert A, El Khoury J, Golenbock DT, Moore KJ.** (2010). CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol.*, 11(2):155-161.
- Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW.** (1988). Functional plasticity of microglia: a review. *Glia.*, 1(5):301-307.
- Streit WJ.** (2004). Microglia and Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci Res.*, 77(1):1-8.
- Streit WJ.** (2005). Microglia and neuroprotection: implications for Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev.*, 48(2):234-239.
- Streit WJ, Xue QS, Tischer J, Bechmann I.** (2014). Microglial pathology. *Acta Neuropathol Commun.*, 2:142.
- Szczepanik AM, Funes S, Petko W, Ringheim GE.** (2001). IL-4, IL-10 and IL-13 modulate A beta(1-42)-induced cytokine and chemokine production in primary murine microglia and a human monocyte cell line. *J Neuroimmunol.*, 113(1):49-62.
- Thanopoulou K, Fragkouli A, Stylianopoulou F, Georgopoulos S.** (2010). Scavenger receptor class B type I (SR-BI) regulates perivascular macrophages and modifies amyloid pathology in an Alzheimer mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 107(48):20816-20821.
- Torres M, Jimenez S, Sanchez-Varo R, Navarro V, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Carmona I, Davila JC, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J.** (2012). Defective lysosomal proteolysis and axonal transport are early pathogenic events that worsen with age leading to increased APP metabolism and synaptic Abeta in transgenic APP/PS1 hippocampus. *Mol Neurodegener.*, 7:59.
- Trujillo-Estrada L, Dávila JC, Sánchez-Mejias E, Sánchez-Varo R, Gomez-Arboledas A, Vizuete M, Vitorica J, Gutiérrez A.** (2014). Early neuronal loss and axonal/presynaptic damage is associated with accelerated amyloid- β accumulation in A β PP/PS1 Alzheimer's disease mice subiculum. *J Alzheimers Dis.*, 42(2):521-541.

- Van Dyken SJ, Locksley RM.** (2013). Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. *Annu Rev Immunol.*, 31:317-343.
- Varnum MM, Ikezu T.** (2012). The classification of microglial activation phenotypes on neurodegeneration and regeneration in Alzheimer's disease brain. *Arch Immunol Ther Exp.*, 60(4):251-266.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ.** (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, 416(6880):535-539.
- Wilcock DM, DiCarlo G, Henderson D, Jackson J, Clarke K, Ugen KE, Gordon MN, Morgan D.** (2003). Intracranially administered anti-Abeta antibodies reduce beta-amyloid deposition by mechanisms both independent of and associated with microglial activation. *J Neurosci.*, 23(9):3745-3751.
- Wilcock DM, Rojiani A, Rosenthal A, Subbarao S, Freeman MJ, Gordon MN, Morgan D.** (2004a). Passive immunotherapy against Abeta in aged APP-transgenic mice reverses cognitive deficits and depletes parenchymal amyloid deposits in spite of increased vascular amyloid and microhemorrhage. *J Neuroinflamm.*, 1(1):24.
- Wilcock DM, Rojiani A, Rosenthal A, Levkowitz G, Subbarao S, Alamed J, Wilson D, Wilson N, Freeman MJ, Gordon MN, Morgan D.** (2004b). Passive amyloid immunotherapy clears amyloid and transiently activates microglia in a transgenic mouse model of amyloid deposition. *J Neurosci.*, 24(27):6144-6151.
- Woodhouse A, Vickers JC, Adlard PA, Dickson TC.** (2009). Dystrophic neurites in TgCRND8 and Tg2576 mice mimic human pathological brain aging. *Neurobiol Aging*, 30(6):864-874.
- Wyss-Coray T.** (2006). Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nat Med.*, 12(9):1005-1015.
- Xiong X, Barreto GE, Xu L, Ouyang YB, Xie X, Giffard RG.** (2011). Increased brain injury and worsened neurological outcome in interleukin-4 knockout mice after transient focal cerebral ischemia. *Stroke*, 42(7):2026-2032.
- Yamamoto M, Kiyota T, Walsh SM, Liu J, Kipnis J, Ikezu T.** (2008). Cytokine-mediated inhibition of fibrillar amyloid-beta peptide degradation by human mononuclear phagocytes. *J Immunol.*, 181(6):3877-3886.
- Yokokura M, Mori N, Yagi S, Yoshikawa E, Kikuchi M, Yoshihara Y, Wakuda T, Sugihara G, Takebayashi K, Suda S, Iwata Y, Ueki T, Tsuchiya KJ, Suzuki K, Nakamura K, Ouchi Y.** (2011). In vivo changes in microglial activation and amyloid deposits in brain regions with hypometabolism in Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 38(2):343-351.
- Yu Y, Ye RD.** (2015). Microglial Aβ receptors in Alzheimer's disease. *Cell Mol Neurobiol.*, 35(1):71-83.
- Zhang B, Gaiteri C, Bodea LG, Wang Z, McElwee J, Podtelezchnikov AA, Zhang C, Xie T, Tran L, Dobrin R, Fluder E, Clurman B, Melquist S, Narayanan M, Suver C, Shah H, Mahajan M, Gillis T, Mysore J, MacDonald ME, Lamb JR, Bennett DA, Molony C, Stone DJ, Gudnason V, Myers AJ, Schadt EE, Neumann H, Zhu J, Emilsson V.** (2013). Integrated systems approach identifies genetic nodes and networks in late-onset Alzheimer's disease. *Cell*, 153(3):707-720.
- Zhao W, Xie W, Xiao Q, Beers DR, Appel SH.** (2006). Protective effects of an anti-inflammatory cytokine, interleukin-4, on motoneuron toxicity induced by activated microglia. *J Neurochem.*, 99(4):1176-1187.
- Zipp F, Aktas O.** (2006). The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.*, 29(9):518-527.



4.

Discusión general y conclusiones

DISCUSIÓN GENERAL

Los diferentes capítulos de resultados han sido discutidos en profundidad previamente, en esta sección sólo se pretende hacer una reflexión final resumiendo los resultados más importantes obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral.

La enfermedad de Alzheimer es la enfermedad neurodegenerativa más prevalente en la población mayor de 70 años y constituye uno de los problemas socio-sanitarios más importantes de nuestra época actual y, a falta de una terapia efectiva, de la futura, teniendo en cuenta el aumento progresivo de la esperanza de vida y el acusado envejecimiento de la población en los países desarrollados. Actualmente, la enfermedad de Alzheimer es incurable y los escasos tratamientos disponibles son exclusivamente sintomáticos produciendo un beneficio cognitivo modesto sin efectos sobre el curso patológico de la enfermedad. El hecho de que las numerosas dianas terapéuticas potenciales que se han ido definiendo, fundamentalmente alrededor de la hipótesis patogénica de la “cascada amiloide”, no se hayan traducido en tratamientos eficaces, pone de manifiesto la necesidad, por un lado, de entender mejor los mecanismos de la enfermedad y, por otro lado, de disponer de modelos animales que mimeticen mejor la patología de los pacientes.

Por tanto, una prioridad en la investigación en la enfermedad de Alzheimer es generar buenos modelos animales, mejorando los existentes, para que reflejen adecuadamente la etiología y progresión de la enfermedad y, por tanto, de alto valor predictivo. Las diferencias entre la patología humana y la que desarrollan los modelos es una de las principales razones de la pobre traslación de los datos preclínicos en animales a la clínica humana (Tabla 4.1). Una de las principales carencias de los modelos animales actuales es la escasa o ausente muerte neuronal en las regiones vulnerables a la enfermedad, mientras que en humanos la EA se caracteriza por una extensa pérdida neuronal que se manifiesta en una reducción del volumen cerebral.

Tabla 4.1. Ventajas y limitaciones del uso de modelos animales transgénicos en la investigación de la enfermedad de Alzheimer. Datos procedentes de Franco y Cedazo-Minguez, 2014 y Langley y col., 2014.

PROS	CONTRAS
Los modelos transgénicos son buenos para la forma familiar de la enfermedad	Sobreexpresan versiones mutantes de proteínas humanas; por tanto, no son modelos adecuados para la forma más común de la enfermedad (el Alzheimer esporádico)
Viabilidad para obtener transgénicos con déficits cognitivos	La mayoría no desarrolla pérdida neuronal; por lo tanto, no son idóneos para ensayar neuroprotección en la EA
Uso en ensayos preclínicos	Muchas de las intervenciones carecen de la farmacocinética del fármaco y de datos sobre la permeabilidad a la barrera hematoencefálica
Son buenos para probar estrategias que mejoran las deficiencias cognitivas	Disparidades entre estudios preclínicos en animales (ambiente controlado) y ensayos clínicos (debido por ejemplo, al uso de co-medicación, enfermedades comórbidas, el estadio de la enfermedad, dosis y tiempo del tratamiento, etc.)
Las intervenciones pueden empezar antes de que la patología aparezca	

Muchas de las intervenciones proporcionan resultados positivos	Ninguna de ellas se ha traducido con éxito a los pacientes
--	--

Por lo tanto, la generación y caracterización de buenos modelos, así como su validación con lo observado en pacientes, es uno de los principales retos biomédicos actuales. Con este fin, nuestro grupo se encuentra centrado en la caracterización a nivel celular y molecular de modelos transgénicos que sobreexpresan las formas mutadas de proteínas implicadas en el desarrollo del Alzheimer, con objeto de 1) estudiar los mecanismos implicados en los cambios neurodegenerativos que acontecen en esta patología (patología amiloide, disfunción axonal y sináptica, disfunción de la proteostasis, neurodegeneración, y en especial el papel de la respuesta neuroinflamatoria en la patología) en regiones altamente vulnerables; 2) identificar potenciales biomarcadores de utilidad diagnóstica (es de destacar que la compañía farmacéutica Sanofi está utilizando los biomarcadores SOM y NPY descritos por nuestro grupo en su programa de screening de fármacos para el Alzheimer), así como dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos; y 3) realizar estudios preclínicos para evaluar la eficacia de nuevas estrategias terapéuticas. De hecho, desde el año 2003, y en colaboración con la industria farmacéutica Sanofi (Francia), el grupo se ha centrado en un modelo transgénico bigénico que sobreexpresa las formas mutadas de PS1 y APP. El modelo PS1_{M146L}/APP_{751SL} presenta deposición temprana de placas de Abeta, muerte neuronal, pérdida sináptica y activación glial (Blanchard y col., 2003; Ramos y col., 2006; Caballero y col., 2007; Jiménez y col., 2008; Moreno-González y col., 2009; Baglietto-Vargas y col., 2010; Jiménez y col., 2011; Sánchez-Varo y col., 2012; Torres y col., 2012; Trujillo-Estrada y col., 2013; Trujillo-Estrada y col., 2014). Actualmente, la investigación del grupo está dirigida, principalmente, a estudiar la respuesta neuroinflamatoria en muestras de pacientes y en modelos con idea de conocer los fenotipos funcionales de las células microgliales activadas y astrocitos reactivos, así como su papel en la progresión de la enfermedad. Los resultados recientes del grupo han revelado grandes diferencias a nivel de la respuesta inmune innata entre pacientes y modelos (resultados no publicados; Sanchez-Mejias, 2015), que podrían explicar el fracaso traslacional de estrategias dirigidas a modular la respuesta inflamatoria. Estos datos apoyan la idea de la necesidad de mejorar los modelos animales actuales para lograr un éxito terapéutico frente a esta devastadora enfermedad.

En la presente Tesis Doctoral, hemos estudiado distintos aspectos patológicos claves de la EA (muerte neuronal, neuroinflamación, patología amiloide y axonal) en diversos modelos transgénicos de la enfermedad con objeto de aumentar su valor predictivo. Además, hemos avanzado en el conocimiento del papel de la respuesta inflamatoria en la progresión de la patología mediante manipulación genética de uno de estos modelos. Por último, hemos evaluado el potencial terapéutico de dos compuestos a nivel preclínico.

De los resultados obtenidos durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, es de destacar que hemos completado la caracterización del proceso neurodegenerativo incluyendo la muerte neuronal (interneuronas y piramidales), alteración del citoesqueleto con daño axonal y sináptico, disfunción lisosomal y acumulación de Abeta en la región del subículo de la formación hipocampal del modelo PS1/APP (Trujillo-Estrada y col., 2014). Nuestros resultados indican que el subículo es la región del hipocampo que más temprano se afecta, mostrando una pérdida temprana selectiva de las neuronas principales (-28%) y de interneuronas SOM-positivas (-69 %). Además, nuestros datos demuestran la existencia de una patología axonal y sináptica a edades tempranas, que podría representar el comienzo de la disfunción/pérdida sináptica. Estos procesos neurodegenerativos se producen en paralelo, y en estrecha asociación, con el inicio y progresión acelerada de la deposición de A β extracelular, lo que apunta a las placas como principales contribuyentes del daño neuronal/axonal. Los datos descritos aquí indican que este modelo de EA muestra un fenotipo neurodegenerativo similar a lo observado en pacientes, y por lo tanto puede ser un modelo muy útil para probar la capacidad terapéutica de los potenciales compuestos neuroprotectores y mejorar los síntomas de la enfermedad.

Hemos analizado también la vulnerabilidad de las neuronas colinérgicas en los núcleos del telencéfalo basal de diferentes modelos transgénicos mediante inmunohistoquímica y estereología. Los resultados revelan una disminución significativa de estas poblaciones a los 12 meses de edad en los animales transgénicos que portan mutaciones en PS1 y TAU, en comparación con los controles de la misma edad y los animales simple transgénicos APP, así como una profunda alteración de los campos axonales terminales en hipocampo y corteza cerebral. En la actualidad, la hipótesis más aceptada en la degeneración del sistema colinérgico implica a la capacidad del Abeta de unirse al receptor de neurotrofinas p75 induciendo la muerte neuronal. Sin embargo, nuestros datos muestran que aquellos animales con sobreproducción de Abeta por mutación en APP no muestran degeneración de esta población neuronal. No obstante, se ha descrito una vulnerabilidad de las neuronas colinérgicas a la patología neurofibrilar. Aquí, proponemos la implicación de la patología de Tau y, lo que es más novedoso, la alteración del complejo γ -secretasa en la degeneración de la población colinérgica. Estos datos son altamente relevantes ya que estas poblaciones son de las más afectadas en los pacientes de Alzheimer, por lo que nuestro modelo transgénico recapitula uno de los procesos neurodegenerativos claves de la patología de humanos añadiendo un gran valor predictivo a los modelos para su uso en estudios preclínicos.

Una vez avanzado en la caracterización neuropatológica del modelo PS1/APP (ver Anexos), se han realizado ensayos preclínicos de potenciales fármacos. Uno de ellos, el carbonato de litio, fármaco utilizado en el tratamiento de trastornos bipolares. El segundo, una nueva estatina desarrollada por la empresa Neuron Bio.

Así, hemos analizado las placas amiloides presentes en el hipocampo del modelo PS1/APP de 9 meses después de un tratamiento oral crónico con carbonato de litio. Era conocido que, al menos en modelos transgénicos de la patología, el tratamiento crónico con litio produce una mejoría cognitiva. Nuestros resultados demuestran que este tratamiento produce un cambio en las propiedades tóxicas de las placas amiloides, con aumento en la compactación (agregación del Abeta) de las placas y una disminución en el anillo periférico de oligómeros de Abeta (OC-positivo) de las mismas, justo lo contrario de lo observado durante la progresión de la patología en los animales controles. Además, este tratamiento con litio produce un efecto protector sobre las poblaciones más vulnerables (interneuronas SOM/NPY), una disminución en la acumulación de autofagosomas, de proteínas ubiquitinadas, de fosforilación de Tau y, en consecuencia, una disminución en el número de distrofias axonales que rodean las placas de Abeta. Por tanto, la modulación de la agregación del Abeta en las placas, puede modular, a su vez, el desarrollo de la patología, al menos en modelos (Trujillo-Estrada y col., 2013). Los estudios más recientes han demostrado que los ratones PS1/APP presentan deficiencias en la ruta de la autofagia (Lee y col., 2010; Jiménez y col., 2011; Sánchez-Varo y col., 2012; Torres y col., 2012), acumulándose proteínas en las distrofias axonales alrededor de las placas, y que el litio puede activar esta vía de degradación proteica (Sarkar y col., 2005). Nuestros datos ponen de manifiesto que la administración oral crónica de litio posee un efecto neuroprotector en este modelo de la EA evitando la muerte neuronal de las poblaciones más vulnerables (SOM/NPY). Hemos demostrado que el litio modifica las propiedades de las placas haciéndolas más pequeñas y más compactas, junto con una reducción de su capacidad tóxica (disminución de la densidad de distrofias axonales asociadas a las placas). Este cambio en la calidad de las placas puede estar mediado por la liberación de proteínas chaperonas por parte de los astrocitos reactivos. Estos datos ponen de manifiesto un mecanismo novedoso mediado por litio capaz de alterar el curso de la enfermedad, representando una potencial e innovadora aproximación terapéutica para el Alzheimer (Trujillo-Estrada y col., 2013).

El siguiente ensayo preclínico consistió en la evaluación del potencial protector de un nuevo compuesto (estatina) diseñado por Neuron Bio. Hemos demostrado que una dieta enriquecida en este compuesto (NST0037) produce un efecto neuroprotector sobre la neuronas SOM-positivas, mejora la patología axonal y reduce significativamente la carga amiloide actuando sobre la vía amiloidogénica reduciendo la actividad γ -secretasa. Estos datos apoyan el uso de esta estatina para futuros estudios clínicos.

Por último, se ha propuesto la existencia de un proceso neuroinflamatorio que podría desempeñar un papel clave en el desarrollo de la enfermedad. Clásicamente, la respuesta microglial se ha asociado al proceso neurodegenerativo observado en la EA. Esta asociación se basa en la capacidad de las células microgliales de activarse, en presencia de cualquier daño cerebral, y producir cantidades elevadas de citoquinas proinflamatorias

citotóxicas (fenotipo M1). Sin embargo, la activación microglial también puede tener un perfil beneficioso (fenotipo M2) con potencial neuroprotector. Este posible papel dual (beneficioso/perjudicial) de la respuesta inflamatoria junto con el desconocimiento de su implicación (causa o consecuencia) en el desarrollo/progresión de la patología, y los continuos fracasos de la terapias antiinflamatorias, hace necesario evaluar con detalle la función de la glía en esta enfermedad. Datos previos de nuestro grupo de investigación demostraban la existencia de una activación microglial en el hipocampo con cambio fenotípico de M2 (neuroprotector) a M1 (citotóxico) a medida que progresa la patología en el hipocampo del modelo PS1/APP (Jiménez y col., 2008). Aquí, hemos modulado la respuesta inflamatoria mediante delección de la IL-4 (citoquina antiinflamatoria) en un modelo de la EA y analizado su efecto sobre la carga amiloide y la supervivencia neuronal. A edades avanzadas, nuestro modelo PS1/APP presenta un ambiente inflamatorio citotóxico coincidente con un aumento de los niveles de oligómeros solubles de Abeta un proceso degenerativo en el que se encuentran afectadas diferentes poblaciones neuronales, como las neuronas principales y las interneuronas SOM/NPY (Jiménez y col., 2008).

Una posible modulación farmacológica de la diferenciación microglial hacia el fenotipo alternativo que potencie la neuroprotección abre futuras vías para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra el Alzheimer. Un conocimiento más detallado de las rutas neuroinmunes y su implicación en la EA puede conducir a un mejor entendimiento y tratamiento de la enfermedad. Por ello, hemos generado un modelo APP *knockout* para IL-4. La delección de IL-4 en este modelo de amiloidosis exacerba la deposición amiloide y provoca un aumento en la activación microglial y de la vulnerabilidad neuronal. La sobreactivación microglial podría afectar la capacidad fagocítica de las células microgliales (respuesta alternativa modulada por IL-4) y por tanto contribuir así a la acumulación extracelular de Abeta y el daño neuronal. Estos resultados están en concordancia con lo observado por parte de nuestro grupo en el hipocampo de pacientes dementes, donde parece existir una disfunción microglial en contraposición a la idea prevalente de una respuesta inmune proinflamatoria citotóxica. Conjuntamente, estos datos apoyan la idea de desarrollar terapias dirigidas a restablecer la función microglial para retrasar la progresión de la patología, en lugar de suprimir la respuesta inflamatoria.

Por otro lado, muchos de los fracasos en fases clínicas están motivados por su aplicación en pacientes en estadios avanzados de la EA, donde el daño neuronal es irreversible. El éxito de los dos estudios preclínicos mostrados aquí (tratamiento con litio y la estatina no comercial NST0037) se debe a que ambos tratamientos se han proporcionado antes del inicio de la patología. Por ello, las intervenciones deben ir encaminadas hacia estadios presintomáticos o prodrómicos de la enfermedad, para lo que se requieren biomarcadores preclínicos y un diagnóstico temprano del Alzheimer como única garantía de acelerar el desarrollo exitoso de una nueva terapia para esta enfermedad.

CONCLUSIONES

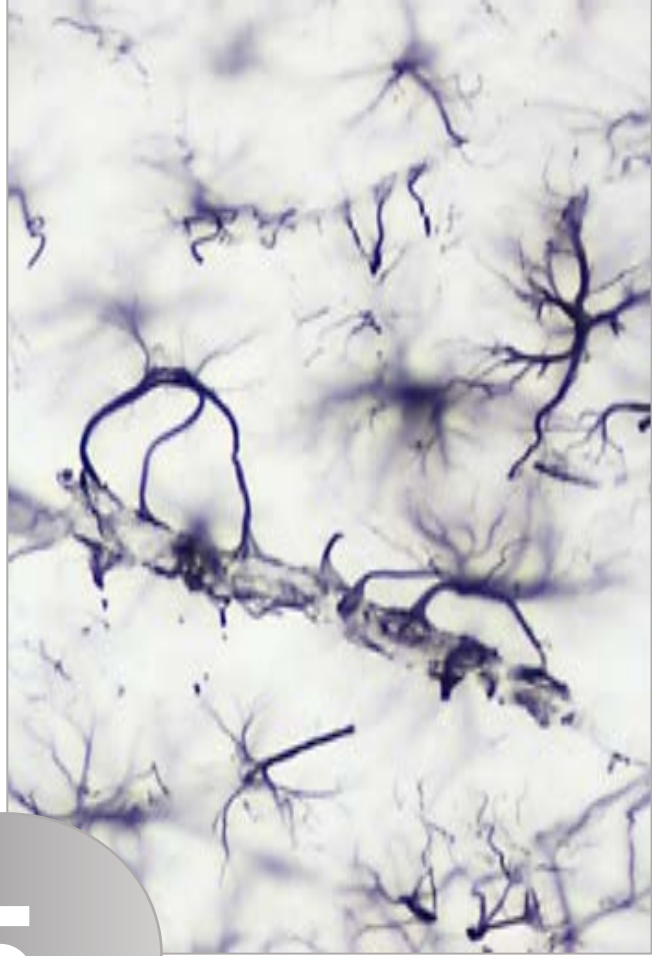
1. El subículo es la región hipocampal que primero se afecta por la patología amiloide y el proceso neurodegenerativo en el modelo PS1/APP, similar a lo observado en pacientes de Alzheimer. Teniendo en cuenta la implicación de esta región cerebral en los procesos de memoria, su afectación temprana podría contribuir al deterioro cognitivo característico de las primeras fases de la enfermedad. Por otro lado, en este modelo tiene lugar la degeneración selectiva de poblaciones colinérgicas del telencéfalo basal al igual que en pacientes. Estos datos validan el uso de este modelo transgénico para la evaluación preclínica de tratamientos terapéuticos dirigidos a modificar el curso de la enfermedad y proteger de la pérdida neuronal.
2. La pérdida de neuronas colinérgicas en el telencéfalo basal ocurre en modelos PS1/APP, PS1 y TAU, sin embargo estas poblaciones neuronales no se ven afectadas en el modelo monogénico APP, al menos hasta los 12 meses de edad. Estos datos indican que la muerte de estas neuronas está asociada a mutaciones en el gen de PS1 y a la patología Tau, posiblemente por pérdida de función γ -secretasa. Estos datos son altamente novedosos y suponen un avance importante en el conocimiento sobre el mecanismo de muerte de las neuronas colinérgicas en esta enfermedad.
3. La administración oral de litio al modelo PS1/APP, previa a la aparición de patología amiloide, resultó en la formación de placas más compactas y menos tóxicas junto con una mejora significativa del proceso degenerativo y los déficits de memoria. Este mecanismo de actuación del litio modificando las propiedades tóxicas de las placas, posiblemente a través de la producción astrogliar de chaperonas, representa una aproximación terapéutica innovadora capaz de alterar el curso de la enfermedad en sus fases iniciales y, por tanto, con gran potencial en futuros ensayos clínicos preventivos.
4. La evaluación preclínica de la nueva estatina NST0037 en un modelo animal PS1/APP reveló un marcado efecto beneficioso sobre la progresión de la patología, con una disminución significativa de la carga amiloide, la patología axonal y la muerte neuronal en la región del hipocampo. Por tanto, esta nueva estatina tiene un gran potencial como fármaco neuroprotector capaz de reducir la progresión de la EA.
5. La ausencia de la interleuquina antiinflamatoria IL-4 en el modelo APP produce un incremento significativo de la patología amiloide y neurítica en el hipocampo, probablemente a través de una sobreactivación microglial que podría afectar a su capacidad fagocítica. La deficiencia de IL-4 induce una respuesta inmune innata de carácter proinflamatorio, con aumento de TNF- α e IL-6, que podría comprometer la viabilidad neuronal. Por tanto, las estrategias antiinflamatorias basadas en la expresión de IL-4 podrían ser eficaces en modificar el curso de la enfermedad.

CONCLUSIONS

1. The subiculum is the first hippocampal region affected by the amyloid pathology and the neurodegenerative process in the transgenic PS1/APP model, similar to that seen in AD patients. Given the involvement of this brain region in memory processes, its early affectation could contribute to the cognitive impairment at early stages of the disease. Furthermore, in this transgenic model, there is a significant degeneration of basal forebrain cholinergic population as occurs in patients. These data validate the use of this transgenic model for preclinical evaluation of potential therapeutic treatments aimed at modifying the course of the disease and protecting neurons.
2. The loss of cholinergic neurons in the basal forebrain occurs in PS1/APP, PS1 and TAU models of Alzheimer's disease. However these neuronal populations are not affected in the monogenic model APP, at least until 12 months of age. These data indicate that the death of these neurons is associated with mutations in the PS1 gene and tau pathology, probably due to loss of function of γ -secretase. These findings are highly innovative and represent an important advance in the understanding of the mechanism of cholinergic neuron death in this disease.
3. The administration of lithium to the PS1/APP model, prior to the onset of amyloid pathology, resulted in the formation of more compact and less toxic plaques and a significant improvement of neurodegenerative process and memory deficits. This lithium-mediated mechanism modifying the toxic properties of the plaques, possibly through astroglial production of chaperones, represents an innovative therapeutic approach capable of altering the course of the disease in its early stages and therefore with great potential in future prevention trials.
4. Preclinical evaluation of the novel statin NST0037 in a PS1/APP animal model revealed a significant beneficial effect on disease progression with reduced amyloid burden, axonal pathology and neuronal death in the hippocampus. Therefore, this novel statin has a great potential as neuroprotective drug able to reduce the progression of AD.
5. The deficiency of anti-inflammatory interleukin IL-4 in the APP model produces a significant increase of amyloid and neuritic pathology in the hippocampus, probably through a microglial overactivation which could affect their phagocytic capacity. Deficiency of IL-4 induces a proinflammatory immune response with increased TNF-alpha and IL-6 levels which may compromise neuronal viability. Therefore, anti-inflammatory strategies based on the expression of IL-4 could be effective in altering the course of the disease.

BIBLIOGRAFÍA

- Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuete M, Vitorica J, Gutierrez A.** (2010). Calretinin interneurons are early targets of extracellular amyloid-beta pathology in PS1/APP Alzheimer mice hippocampus. *J Alzheimers Dis.*, 21(1):119-132.
- Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, Planche M, Canton T, Jedidi I, Gohin M, Wirths O, Bayer TA, Langui D, Duyckaerts C, Tremp G, Pradier L.** (2003). Time sequence of maturation of dystrophic neuritis associated with Abeta deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp Neurol.*, 184(1):247-263.
- Caballero C, Jimenez S, Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Gavilan MP, Ramos B, Del Rio JC, Vizuete M, Gutierrez A, Ruano D, Vitorica J.** (2007). Inter-individual variability in the expression of the mutated form of hPS1M146L determined the production of Abeta peptides in the PS1xAPP transgenic mice. *J Neurosci Res.*, 85(4):787-797.
- Franco R, Cedazo-Minguez A.** (2014). Successful therapies for Alzheimer's disease: why so many in animal models and none in humans? *Front Pharmacol.*, 5:146.
- Jimenez S, Baglietto-Vargas D, Caballero C, Moreno-Gonzalez I, Torres M, Sanchez-Varo R, Ruano D, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J.** (2008). Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *J Neurosci.*, 28(45):11650-61.
- Jimenez S, Torres M, Vizuete M, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Trujillo-Estrada L, Carmona-Cuenca I, Caballero C, Ruano D, Gutierrez A, Vitorica J.** (2011). Age-dependent accumulation of soluble amyloid beta (Abeta) oligomers reverses the neuroprotective effect of soluble amyloid precursor protein-alpha (sAPP(alpha)) by modulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-GSK-3beta pathway in Alzheimer mouse model. *J Biol Chem.*, 286(21):18414-18425.
- Langley GR.** (2014). Considering a new paradigm for Alzheimer's disease research. *Drug Discov Today*, 19(8):1114-1124.
- Lee JH, Yu Wh, Kumar A, Lee S, Mohan PS, Peterhoff CM, Wolfe DM, Martinez-Vicente M, Massey AC, Sovak G, Uchiyama Y, Westaway D, Cuervo AM, Nixon RA.** (2010). Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell*, 141:1146-1158.
- Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, del Rio JC, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuete M, Vitorica J, Gutiérrez A.** (2009). Extracellular Amyloid- β and cytotoxic glial activation induce significant entorhinal neuron loss in young PS1_{M146L}/APP_{751SL} mice. *JAlzheimersDis.*, 18:755-76.
- Ramos B, Baglietto-Vargas D, del Río JC, Moreno-González I, Santa-María C, Jiménez S, Caballero C, Lopez-Tellez JF, Khan ZU, Ruano D, Gutierrez A, Vitorica J.** (2006). Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1xAPP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 27(11):1658-1672.
- Sanchez-Mejias E.** (2015). Estudio neuropatológico del hipocampo y giro parahipocampal en la enfermedad de Alzheimer: de modelos transgénicos a humanos. Tesis Doctoral, Universidad de Málaga.
- Sanchez-Varo R, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, De Castro V, Jimenez S, Ruano D, Vizuete M, Davila JC, Garcia-Verdugo JM, Jimenez AJ, Vitorica J, Gutierrez A.** (2012). Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer's mice hippocampus. *Acta Neuropathol.*, 123(1):53-70.
- Sarkar S, Floto RA, Berger Z, Imarisio S, Cordenier A, Pasco M, Cook LJ, Rubinsztein DC.** (2005). Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J Cell Biol.*, 170(7):1101-1111.
- Torres M, Jimenez S, Sanchez-Varo R, Navarro V, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Carmona I, Davila JC, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J.** (2012). Defective lysosomal proteolysis and axonal transport are early pathogenic events that worsen with age leading to increased APP metabolism and synaptic Abeta in transgenic APP/PS1 hippocampus. *Mol Neurodegener.*, 7:59.
- Trujillo-Estrada L, Jimenez S, De Castro V, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Navarro V, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Davila JC, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J.** (2013). In vivo modification of Abeta plaque toxicity as a novel neuroprotective lithium-mediated therapy for Alzheimer's disease pathology. *Acta Neuropathol Commun.*, 1(1):73.
- Trujillo-Estrada L, Dávila JC, Sánchez-Mejias E, Sánchez-Varo R, Gomez-Arboledas A, Vizuete M, Vitorica J, Gutiérrez A.** (2014). Early neuronal loss and axonal/presynaptic damage is associated with accelerated amyloid- β accumulation in A β PP/PS1 Alzheimer's disease mice subiculum. *JAlzheimers Dis.*, 42(2):521-541.



5.

Summary

PhD Thesis – 2015

Thesis Title: NEUROPATHOLOGICAL CHARACTERIZATION AND PRECLINICAL EVALUATION OF POTENTIAL THERAPEUTIC STRATEGIES IN TRANSGENIC ANIMAL MODELS OF ALZHEIMER'S DISEASE

Author (PhD Student): Laura Isabel Trujillo Estrada. Bachelor in Biology.

Laboratory Address: Dept. Cell Biology, Genetics and Physiology (Cell Biology Area). Faculty of Sciences. University of Malaga. Teatinos 29071. Malaga, Spain.

PhD Supervisors

Dr. Antonia Gutierrez and Dr. David Baglietto Vargas.

Grants Support:

This work was supported by grants FIS PI09/00099 and FIS PI12/01431 from Carlos III Health Institute (Ministry of Economy and Competitiveness; Spain) and by CIBERNED (Spain). Laura Isabel Trujillo Estrada was sponsored by a PhD fellowship from FPU program (Ministry of Education, Spain).

List of Original Communications (publications in peer-reviewed journals):

1. Trujillo-Estrada L, Dávila JC, Sánchez-Mejias E, Sánchez-Varo R, Gomez-Arboledas A, Vizuete M, Vitorica J, Gutiérrez A. (2014). Early neuronal loss and axonal/presynaptic damage is associated with accelerated amyloid- β accumulation in A β PP/PS1 Alzheimer's disease mice subiculum. *J Alzheimers Dis.*, 42(2):521-541.
2. Trujillo-Estrada L, Jimenez S, De Castro V, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Navarro V, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Davila JC, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J. (2013). In vivo modification of Abeta plaque toxicity as a novel neuroprotective lithium-mediated therapy for Alzheimer's disease pathology. *Acta Neuropathol Commun.*, 12;1(1):73.
3. Sanchez-Varo R, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, De Castro V, Jimenez S, Ruano D, Vizuete M, Davila JC, Garcia-Verdugo JM, Jimenez AJ, Vitorica J, Gutierrez A. (2012). Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer's mice hippocampus. *Acta Neuropathol.*, 123(1):53-70.

4. Torres M, Jimenez S, Sanchez-Varo R, Navarro V, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Carmona I, Davila JC, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J. (2012). Defective lysosomal proteolysis and axonal transport are early pathogenic events that worsen with age leading to increased APP metabolism and synaptic Abeta in transgenic APP/PS1 hippocampus. *Mol Neurodegener.*, 7:59.
5. Jimenez S, Torres M, Vizuete M, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Trujillo-Estrada L, Carmona-Cuenca I, Caballero C, Ruano D, Gutierrez A, Vitorica J. (2011). Age-dependent accumulation of soluble amyloid beta (Abeta) oligomers reverses the neuroprotective effect of soluble amyloid precursor protein-alpha (sAPP(alpha)) by modulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-GSK-3beta pathway in Alzheimer mouse model. *J Biol Chem.*, 286(21):18414-18425.
6. Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuete M, Vitorica J, Gutierrez A. (2010). Calretinin interneurons are early targets of extracellular amyloid-beta pathology in PS1/AbetaPP Alzheimer mice hippocampus. *J Alzheimers Dis.*, 21(1):119-132.
7. Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Del Rio JC, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuete M, Vitorica J, Gutierrez A. (2009). Extracellular amyloid-beta and cytotoxic glial activation induce significant entorhinal neuron loss in Young PS1(M146L)/APP(751SL) mice. *J Alzheimers Dis.*, 18(4):755-776.

In addition, this thesis contains unpublished data.

6.1. INTRODUCTION

6.1.1. Alzheimer's disease

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of cognitive decline in the elderly, being characterized by progressive loss of memory and other cognitive functions and changes in personality (review by Reiman and Caselli, 1999; Van Strien et al., 2009). The proportion of the elderly people is growing, and the prevalence and incidence of AD have been shown to increase exponentially with age (review by Prince et al., 2013). It has been estimated that 5% of the population older than 65 years is affected by Alzheimer's disease. The prevalence doubles approximately every 5 years beyond age 65 and nearly half of the people aged 85 years and older suffer from this devastating disorder (<http://www.alz.co.uk/research/world-report-2014>). Due to the demographic development, undoubtedly the number of patients and the economic impact of AD will grow extraordinarily in the future without advances in therapy or prevention.

AD is etiologically heterogeneous, multifactor disease. A small proportion of AD cases show an autonomic dominant transmission of the disease (Castellani et al., 2010; Ballard et al., 2011), and currently mutations in the genes encoding amyloid precursor protein (APP), presenilin 1 (PS1) and presenilin 2 (PS2) have been characterized in early onset familial AD cases (review by Bagyinszky et al., 2014). Mutations in each of these genes also result in elevated levels of A β , a proteolytic processing fragment of the APP, which is deposited in the brains of AD patients.

The clinical picture of dementia, as well as the histopathological findings was described by the German psychiatrist Alois Alzheimer. His findings were published in his famous report 'Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde' ('A characteristic disease of the cerebral cortex') in 1907. Macroscopic changes found in AD brain include shrinkage of the gyrus and widening of the sulcus especially in frontotemporal areas, thickening of meninges and enlargement of the ventricles (review by Perl, 2010; Nasrallah and Wolk, 2014; Eskildsen et al., 2015). The memory centers hippocampal formation and the entorhinal cortex are the first regions to be affected. As the disease progresses, more regions are affected including the temporal and parietal lobes. The two major microscopy lesions are amyloid plaques and neurofibrillary tangles (NFT) (review by Duyckaerts et al., 2009; Serrano-Pozo et al., 2011). The senile plaques are extracellular deposits of amyloid-beta (A β) peptides with a dense central core, surrounded by dystrophic neurites, indicating that a neurodegenerative process is taking place. The NFTs are abnormal, filamentous inclusions found in the cell bodies of neurons primarily composed of abnormally phosphorylated tau protein. Other AD lesions include synaptic alterations, pyramidal neuronal loss as well as interneurons from hippocampus and cholinergic cells from basal forebrain (Whitehouse et al., 1981; West et al., 1994; Gomez-Isla et al., 1996; Agostinho et al., 2010) and inflammation characterized by activated microglia associated

with Abeta deposits an up-regulation of many mediators of inflammatory response (review by Latta et al., 2014; Heneka et al., 2015). Although discovered already a century ago, plaques and tangles are, till today, still the defining criteria for a definite post-mortem diagnosis.

The dominating hypothesis to explain the mechanisms leading to AD is the amyloid cascade hypothesis (Hardy and Higgins, 1992; Haas and Selkoe, 2007), which states that the A β , a fragment of the amyloid precursor protein (APP), plays a central role in the pathogenesis. A β is produced proteolytically from APP by the so called β - and γ -secretases (review by Zhang et al., 2011; Rajendran and Annaert, 2012). It is believed that accumulation of β -amyloid (in particular of the A β 42 peptide) in the brain initiates a cascade of events that ultimately leads to neuronal dysfunction, neurodegeneration and dementia (review by Crews and Masliah, 2010; Karran et al., 2011).

6.1.2. Animal models of Alzheimer's disease

In the last decade, multiple lines of transgenic (tg) mice over-expressing one or more of the familial AD-linked mutated genes have been created (review by Ashe and Zahs, 2010; Bilkei-Gorzo, 2014; Neha et al., 2014; Webster et al., 2014). Although none of the mouse models recapitulates all aspects of AD, several lines do develop robust AD-like pathology, including Abeta plaques surrounded by phospho-tau containing dystrophic neurites, synaptic damage, and age-related learning and memory deficits. These tg mouse models have provided new opportunities to investigate the biochemical and cellular mechanisms underlying this devastating neurodegenerative disorder, and have helped to identify the link between elevated soluble Abeta content, neuronal dysfunction and memory impairment.

The lack of effective therapies for Alzheimer's disease is mainly due to the lack of selective/functional pharmacological targets and animal models that recapitulate the neurodegenerative process described in patients. Animal models are important tools in the discovery and development of treatments. Challenges in translating preclinical studies to clinical trials include the inability of animal models to recapitulate the human disease (Yamada and Nabeshima, 2000; Ashe y Zahs, 2010; Bilkey-Gorzo, 2014; Neha y col., 2014; Webster y col., 2014). In recent years, it has become evident that AD starts decades prior to its clinical presentation, based on biomarker studies in familial and sporadic forms of the disease. Exploring the neuropathology of AD in such early stages is not an easy task. Transgenic animal models can shed much light on the many factors impacting or accelerating disease progression.

6.1.3. Therapeutic approaches for AD

Although the pathogenesis of Alzheimer's disease is not completely understood, several different pharmacological strategies for treatment have been launched

(<http://www.alz.org/trialmatch>). Current medications for the treatment of Alzheimer's disease include acetylcholinesterase inhibitors and NMDA (N-methyl D-aspartate)-receptor antagonist. All of these drugs seem to be able to produce modest symptomatic improvements in some of the patients (Huang and Mucke, 2012) and none of the available medications, however, appears to be able to cure Alzheimer's dementia or to stop the disease progression. The development of novel drugs with strong disease-modifying properties represents one of the biggest unmet medical needs today. Though immunotherapies have failed so far, different clinical trials are still focusing on decreasing Aβ (review by Karran and Hardy, 2014), and several trials in pre-symptomatic Alzheimer's disease are using monoclonal drugs targeting amyloid:

- A4 study (Anti-Amyloid Treatment in Asymptomatic Alzheimer's) in cognitively normal 65–85 year olds who have abnormal amyloid deposition as determined by PET scans.
- Dominantly Inherited Alzheimer's Network study in pre-symptomatic individuals with dominantly inherited Alzheimer's disease
- Alzheimer's Prevention Initiative in a large familial cohort with a known autosomal dominant Alzheimer's disease mutation.

These studies will be vital for understanding the role of amyloid in Alzheimer's disease pathogenesis. The A4 study will shed light on whether late onset sporadic AD behaves in a biologically similar way to inherited early onset Alzheimer's disease.

There are numerous other drugs currently being trialled including anti-Tau therapies (review by Franco and Cedazo-Minguez, 2014; Schneider et al., 2014), anti-inflammatory and antioxidant therapies (review by Chiang and Koo, 2014), and even stem cell approaches (Choi et al., 2014).

6.1.4. Aims of the study

Our research group has been focused on 1) characterizing at cellular and molecular level several models of AD in order to study the mechanisms involved in neurodegenerative changes in the most vulnerable brain regions, and 2) identifying potential biomarkers of diagnostic value and testing novel drugs for the treatment of disease.

Therefore, and taking into account the above background, the main objective of this PhD Thesis *is to further extent the neuropathological characterization of transgenic models of Alzheimer's disease and to test the efficacy of potential neuroprotective treatments by preclinical evaluation using these animal models*. To do this, we propose the following specific objectives:

- Objective 1. To characterize at cellular and molecular levels the neurodegenerative process occurring in AD transgenic models focusing on 1) the subicular region of hippocampus and 2) the basal forebrain cholinergic neurons.

Objective 2. To study the potential neuroprotective effect of lithium as well as a novel statin (NST0037) on the disease progression in PS1/APP transgenic models of AD.

Objective 3. To analyze the effect of interleukin-4 deficiency on the disease progression in a transgenic model of AD.

6.2. MATERIALS Y METHODS

6.2.1. Transgenic mice

The generation and initial characterization of the PS1/APP tg mice has been reported previously (Blanchard et al., 2003). PS1 tg mice (C57BL/6 background) over-expressed the mutated PS1M146L form under the control of the HMGCoA reductase promoter. PS1/APP double tg mice (C57BL/6 background) were obtained by crossing homozygotic PS1 tg mice with heterozygotic Thy1-APP751SL (Swedish –K670N,M671L- and London –V717I- FAD mutations; from now on APP) mice (Charles River, France). Mice represented F6-F10 offspring of heterozygous tg mice. We used PS1, APP and PS1/APP for the studies (Sanofi, France).

PS1dE9/APPswe transgenic mice (referred here as PS1d9/APP; Jankowsky et al., 2004) over-expressed PS1dE9 under the control of PrP promotor, and the APP695 with the Swedish mutation. These animals come from Jackson Laboratories.

Thy-Tau22 transgenic mice (referred to as TAU in this report) which over-expressed the 4-R human Tau form with the mutations G272V and P301S under the control of Thy1.2 promotro (Schindowski et al., 2006).

Non-tg mice of the same genetic background and ages were used as controls. All animal experiments were carried out in accordance with the European Union regulations and approved by the committee of animal use for research at Malaga Universty.

Lithium treatment. For lithium treatment, PS1 and PS1/APP mice (3 month old at the beginning of treatment) were randomly divided into two groups (n=25 each). Mice were fed, ad libitum, with standard mice diet (2014 Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet, Harlan, Spain) or standard mice diet supplemented with lithium carbonate (1.2 g/kg 2014 diet, Harlan, Spain). The lithium group received an additional drinking bottle containing NaCl (0.7%). The treatment was continued for 6 months (Trujillo-Estrada et al., 2013). The control and treated mice were weighted weekly and no significant weight loss was detected (29.20 ± 1.09 g vs 27.5 ± 2.2 g for control and Li-treated PS1/APP mice, respectively). For the plasmatic Li content, mice were bled (100 μ l) from the ocular artery. The plasmatic lithium levels were stable during the treatment and also were within the therapeutic range: 0.44 ± 0.07 mEquiv/l (n=10) after 71 days of treatment or 0.38 ± 0.05 mEquiv/l (n=10) at the end of treatment. This treatment was well tolerated with

a low mortality during this period (PS1 control, 0%; PS1 lithium, 0%; PS1/APP control, 20%; PS1/APP lithium, 7.4%).

Statin treatment. Oral Statin treatment (enriched diet) was supplied to animals by Neuron Biopharma, starting at 6 months and ending at 12 months (6 months of treatment). Animals (all PS1d9/APP tg mice) were divided into three groups, two of them were treated with the statin. Group A consist of PS1d9/APP tg mice with a higher dose (n=5); group B with a lower dose (n=11); finally, control group (group C) consist of tg mice without treatment (normal diet) (n=8).

Genetic deletion of IL-4 from APP transgenic mice. Tg APPswe mice (referred to as APP in this report) were bred with IL-4 knockout mice (from Jackson Laboratory) obtaining APP/IL4^{-/-} mice . The deletion of IL-4 was assessed by RT-PCR.

6.2.2. Anatomical boundaries

Delimitation of brain structures was made according to Franklin and Paxinos Atlas (2007). We studied the basal cholinergic system consisting of medial septum (from 1.18 to 0.6 mm of Bregma), vertical limb of diagonal band of Broca (from 1.34 to 0.74 mm) and nucleus basalis of Meynert (from -0.34 to 1.06 mm). Moreover, we analyzed several cortical areas including retrosplenial cortex (from -0.94 to -4.24) and primary visual cortex (from -2.18 to -5.20 mm). Finally we analyzed the hippocampal formation which includes the subiculum, the hippocampus proper and the dentate gyrus. The mice hippocampus can be found from Bregma -0.94 to -4.04 mm, whereas the subiculum is located between Bregma -2.46 to -4.36 mm.

6.2.3. Tissue preparation

After deep anaesthesia with sodium pentobarbital (60 mg/kg), mice were perfused transcardially with 0.1 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, followed by 4% paraformaldehyde, 75 mM lysine, 10 mM sodium metaperiodate in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. Brains were then removed, post-fixed overnight in the same fixative at 4 °C, cryoprotected in 30% sucrose, sectioned at 40 µm thickness in the coronal plane on a freezing microtome and serially collected in wells containing cold PBS and 0.02% sodium azide. Each experiment was composed of 4-6 sets of animals (containing control and transgenic mice).

6.2.4. Histological stainings: Thioflavin S and Congo red

Free-floating sections were incubated for 5 minutes with 0.015% Thioflavin S (Sigma) in 50% ethanol, and then washed in 50% ethanol, mounted onto gelatin-coated slides and coverslipped with 0.01 M PBS containing 50% glycerine and 2.5% triethylenediamine.

Free-floating sections were incubated for 3 minutes with 20% Congo red (Sigma) in 100° ethanol with NaCl 0.03%, and then washed in PBS. Sections were mounted on gelatin-coated slides, air-dried, dehydrated in graded ethanol, cleared in xylene and coverslipped with DPX (BDH) mounting medium.

6.2.5. Immunohistochemistry

Serial sections from control and transgenic mice were assayed simultaneously for light and confocal microscopy immunohistochemistry using same batches of solutions to minimize variability in immunolabeling conditions as previously reported (Ramos et al., 2006; Jimenez et al., 2008).

Sections from different animals and ages were processed in parallel using same batches of solutions to minimize variability in immunolabeling conditions. Free-floating sections were first pretreated with 3% H₂O₂ /3% methanol in PBS pH 7.4 for 20 min to inhibit endogenous peroxidase, and with avidin-biotin Blocking Kit (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) for 30 min to block endogenous avidin, biotin and biotin-binding proteins. For single immunolabeling, sections were incubated overnight at room temperature with one of the following primary antibodies: anti-A β 1–42 rabbit polyclonal (1:5000 dilution, Abcam); anti-OC rabbit polyclonal (1:5000 dilution, Millipore); anti-6E10 mouse monoclonal (1:5000, Covance); anti-4G8 mouse monoclonal. (1:2000, Covance); anti-ChAT goat polyclonal (1:1000, Chemicon); anti-APP rabbit polyclonal (1:20000, Sigma); Anti-Claretinin rabbit polyclonal (1:5000, Swant); anti-Catepsin D goat polyclonal (1:100, Santa Cruz Biotechnology); anti-GFAP chicken polyclonal (1:2000, Chemicon); anti-Hsp27 rabbit polyclonal (1:1000, Sigma); anti-Iba1 rabbit polyclonal (1:1000, Wako); anti-LAMP2 rabbit polyclonal (1:500, Abcam); anti-LC3b rabbit polyclonal (1:1000, Cell signaling); anti-MAP2 rabbit polyclonal (1:5000, Chemicon); anti-Neurofilamento M rabbit polyclonal (1:500, Chemicon); anti-NPY rabbit polyclonal (1:5000, Sigma); anti-NeuN monoclonal antibody (1:1000, Chemicon); anti-p75 rabbit polyclonal (1:1000, Promega); anti-Parvalbumin (PV) rabbit polyclonal (1:5000, Swant); anti-sinaptophysin rabbit polyclonal (1:1000, Abcam); anti-somatostatin (goat polyclonal (1:1000; Santa Cruz Biotechnology); anti-AT8 mouse monoclonal (1:250, Pierce); anti-Ubiquitin rabbit polyclonal (1:5000, Dako); anti-VGAT guinea pig polyclonal (1:5000, Calbiochem); anti-VGluT guinea pig polyclonal (1:10000, Chemicon); anti-VIP rabbit polyclonal (1:5000, AntibodyBcn); over 24 or 48 hours at room temperature. To retrieve intracellular A β , sections were pre-treated for 7 minutes with 85% formic acid before incubation with the anti-A β antibodies. For general antigen retrieval method sections were previously heated at 80 °C for 20 minutes in 50 mM citrate buffer pH 6.0.

The tissue-bound primary antibody was detected by incubating with the corresponding biotinylated secondary antibody (1:500 dilution, Vector Laboratories), and then followed by 1:2000 streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (Sigma Aldrich).

The peroxidase reaction was visualized with 0.05% 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), 0.03% nickel ammonium sulphate, and 0.01% hydrogen peroxide in PBS. Specificity of the immune reactions was controlled by omitting the primary antisera.

For double DAB/nickel-DAB immunohistochemical labeling sections were first incubated with the first primary antibody as described above. After the DAB-nickel reaction (dark blue end product), sections were then incubated with the second primary antibody. The second immunoperoxidase reaction was developed with DAB only (brown reaction end product). 5x multiple immunoperoxidase labeling was carried out as described before (Moreno-Gonzalez et al., 2009).

For double or triple immunofluorescence labelings, sections were first sequentially incubated with the indicated primaries antibodies followed by the corresponding Alexa488/568/405 secondary antibodies (1:1000 dilution; Invitrogen). Sections were examined under a confocal laser microscope (Leica SP5 II) or Olympus BX-61 epifluorescent microscope.

6.2.6. Electron microscopy

For transmission electron microscopy (TEM), fixed brains were sectioned at 50 μm or 250 μm thickness in the coronal plane on a vibratome (Leica VT1000S) and serially collected in wells containing cold PB and 0.02% sodium azide. For standard electron microscopy, the 250 μm -thick sections were postfixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M PB, block stained with uranyl acetate, dehydrated in acetone, and flat embedded in Araldite (EMS, USA). Selected areas were cut in ultrathin sections and examined with an electron microscope (JEOL JEM1400).

For the immunogold labeling, the 50 μm sections were first washed with PBS and incubated in a 50 mM glycine solution 5 minutes in order to increase the antibody binding efficiency. Following the standard immunohistochemical protocol, the tissue was incubated 48 h in primary antibody in a PBS 0.1 M/0.02%Tx-100/1% BSA solution at 22 °C. Then, sections were washed in PBS, and incubated with 1.4 nm gold-conjugated secondary antibody overnight at 22 °C. After postfixing with 2% glutaraldehyde and washing with 50 mM sodium citrate, the labelling was enhanced with the HQ SilverTM Kit (Nanoprobes), and gold toned. Finally, the immunolabeled sections were processed as above by the osmium fixation, dehydration and embedding steps. In negative control experiments, the primary antibody was omitted.

6.2.7. Stereological analysis

Numerical density analysis

Immunopositive cells belonging to the different animal groups and ages were stereologically quantified. Briefly, the quantitative analyses were performed using an

Olympus BX61 microscope interfaced with a computer and a Olympus DP71 digital camera, and the NewCAST (Computer Assisted Stereological Toolbox) software package (Olympus, Denmark). The number of neurons was quantified in every 7th section (with a distance of 280 μm between sections) through the rostrocaudal extent of the subiculum (between -2.46 mm anterior and -4.60 mm posterior to Bregman coordinates, according to the atlas of Franklin and Paxinos (Franklin and Paxinos, 2008)). An average of 6-7 sections was measured in each animal.

The cerebral area was defined using a 4x objective and the number of neurons was counted using a 100x/1.35 objective. We used a counting frame of $902.52 \mu\text{m}^2$ with step lengths of $46.98 \mu\text{m}$. The numerical density (ND; cells/ mm^3) was estimated using the following formula: $\text{ND} = Q/(\Sigma A * h)$, where 'Q' is the number of dissector-counted somatic profiles, ' ΣA ' is the area of the counting frame, and 'h' is the height of the optical dissector ($10 \mu\text{m}$). An investigator who was blind to the experimental conditions (age, genotype or treatment, and marker) performed neuronal profile counting.

Plaque size morphometric analysis

Five coronal sections stained with Thioflavin S from different genotypes/treatments and ages were analyzed using the nucleator method with isotropic probes by the NewCAST software package from Olympus stereological system. For individual plaque measurement, a 40x objective was used. Number of plaques/ mm^2 falling into four surface categories (ranging from $<200 \mu\text{m}^2$ to $>2000 \mu\text{m}^2$) was calculated.

6.2.8. Densitometry image analysis

Plaque loading quantification

Plaque loading was defined as percentage of total cerebral area stained for A β . Quantification of extracellular A β content was performed as previously reported (Moreno-Gonzalez et al., 2009). First we capture the images from Thioflavin S or Abeta42 staining. The camera settings were adjusted at the start of the experiment and maintained for uniformity. Digital images from different genotypes/treatments and ages were analyzed using Visilog 6.3 analysis program (Noesis, France). The plaque positive area within the region was identified by level threshold which was maintained throughout the experiment for uniformity. The color images were converted to binary images with plaques.

The region area in each 4x image was manually outlined. The plaque loading (%) for each tg mouse was estimated and defined as (sum plaque area measured/sum cortical area analyzed) x 100. The sums were taken over all slides sampled and a single plaque burden was computed for each mouse. The mean and standard deviation (SD) of the plaque loading were determined using all the available data. Quantitative comparisons were

carried out on sections processed at the same time with same batches of solutions. A total of 5 sections/animal and 4-6 animal/group were analyzed.

Dystrophic neurites loading

The procedure followed to carry out the quantification of dystrophic neurites load is the same as described above for plaque loading.

Oligomeric plaque halo

To analyze the oligomeric Abeta halo located at the periphery of the plaques, 40 μm floating sections were first stained with Thioflavin S and then followed by an antibody specific to oligomers of Abeta (OC antibody) visualized with anti-rabbit Alexa568-conjugated secondary antibody. Images were acquired by using a Leica SP5 II confocal laser microscope. A total of 15 plaques per animal were randomly photographed in CA1 subfield of control and lithium-treated animals (n=3 per group). Laser settings were adjusted at the start of the experiment and maintained for uniformity. Images were analyzed using LAS AF Lite program (Leica). Plaque area was determined for Thioflavin S staining (plaque core in green color) and OC immunostaining (oligomeric Abeta in red color) and the difference between the OC area and the core area was considered as the oligomeric halo surrounding plaques.

Plaque compaction analysis

Abeta42 immunostained hippocampal sections from control and lithium-treated animals were observed under a Nikon Eclipse 50i microscope and CA1 plaques were photographed using a 10x objective. Images were acquired with a Nikon DS-5M high resolution digital camera. The camera settings were adjusted at the start of the experiment and maintained for uniformity. Digital images (5 sections/mouse, n=5 per group) were analyzed using Visilog 6.3 analysis program (Noesis, France). Abeta42 staining density was identified by bright-level threshold, the level of which was maintained throughout the experiment for uniformity. The gray-scale image was converted to a binary image for estimating the optical density which was defined as pixel units and related with the plaque size (μm^2 which area was measured using the same program). Quantitative comparisons were performed on sections processed at the same time.

Microglia morphology analysis

For the analysis of sphericity index in the APP an APP/IL4^{-/-} animals immunostained sections for Iba1 microglial marker were used. These images were processed with Visilog 6.3. This quantification was performed using the sphericity index described, previously, by Heppner et al. (1998). To this end, the periphery of different individual microglial cells located around Abeta plaques was binarized to determine the cell area and perimeter.

6.2.9. RNA extraction and RT-PCR

Total RNA from mice was extracted using Tripure Isolation Reagent (Roche) as described previously (Ramos et al., 2006; Jimenez et al., 2008; Jimenez et al., 2011). After isolation, RNA integrity was assessed by agarose gel electrophoresis. The yield of total RNA was determined by measuring the absorbance (260:280nm) of isopropanol-precipitated aliquots of the samples. The recovery of RNA was comparable in all studied groups.

Retrotranscription (RT) was performed using random hexamers, 4 µg of total RNA as template and High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) following the manufacturer recommendations (Ramos et al., 2006; Jimenez et al., 2008). For real time RT-PCR, commercial Taqman™ probes (Applied Biosystems) were used for amplification. PCR reactions were carried out using either ABI Prism 7000 or 7900 HT sequence detector systems (Applied Biosystems). A standard curve was first constructed for every assay, using increasing amounts of cDNA. In all cases, the slope of the curves indicated optimal PCR conditions. The cDNA levels of the different mice were determined using GAPDH as housekeeper. Therefore, GAPDH amplification was done in parallel with the gene to be analyzed, and this data used to normalize target gene results. Independently of the analyzed gene, results were always expressed using the comparative Ct method, following the Bulletin number 2 from Applied Biosystems.

6.2.10. Total protein extraction and Western blots

The protein pellets, obtained using the Tripure Isolation Reagent and isopropanol-mediated precipitation, were resuspended in 4% SDS and 8 M urea in 40 mM Tris-HCl, pH 7.4 and rotated overnight at room temperature to get complete protein solubilization. The protein content was evaluated using Lowry method.

Western blots were performed as described (Araujo et al., 1996). Briefly, 5-20 µg of proteins from the different samples were loaded on 16%-SDS-tris-tricine-PAGE or 12%-SDS-tris-glycine-PAGE and transferred to nitrocellulose (Hybond-C Extra; Amersham). After blocking, using 5% non-fat milk, membranes were incubated overnight, at 4 °C, with the appropriate antibody. Membranes were then incubated with the corresponding horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibody (Dako, Denmark) at a dilution of 1/8000. Each blot was developed using the ECL-plus detection method (Amersham) and quantified using Image-Quant Las 4000 mini gold (GE Healthcare Bio-Sciences). For normalization purposes, proteins were first estimated by Lowry and protein loading corrected by beta-actin.

6.2.11. Behavioral analysis

Behavioral analysis for lithium experiments

Experiments were conducted on age-matched male WT (n=10), PS1 (n=10), PS1/APP control (n=9) and PS1/APP lithium-treated (n=9) mice. Mice were tested at 9

months of age, two days previous to sacrifice. All testing were performed in the light period of the light/dark cycle and the experiment was blind to the genotypes and treatment of mice. Animals were adapted to the experimental conditions for 6 days before behavioral testing. All mice were moved to the testing room in their home-cage and kept in the room during 1 hour to habituate to the new location; then, they were handled gently each day briefly in order to minimize non-specific stress.

Open-field test

Besides the use of the open-field to habituate animals to the cage before the object recognition test, we examined motor function by means of spontaneous locomotor activity (Filali et al., 2012). In this test, mice were placed in the centre of a square-shape arena (45 cm x 45 cm) and were allowed to explore the area for 5 minutes. The arena was thoroughly cleaned with 70% ethanol solution after each trial. The locomotor activity was measured by an automated monitoring system (Ethovision, Noldus, The Netherlands). Distance travelled and velocity was quantified.

Object recognition test

The object recognition test is based in the natural tendency of rodents to explore objects (spontaneous exploratory behavior). In the present study, we used a modified protocol (Davis et al., 2013) based in the preference for the “old familiar object” over the “recent familiar object” and the preference for a novel location. Sixty minutes after habituation to the open-field, animals were first exposed to four identical objects arranged in a triangle shaped configuration and allowed to explore them for 10 minutes (Sample 1). After a delay of 2 hours, the mice received a second sample trial identical to the first, except that a novel set of four identical objects were present (Sample 2). The test trial started after 2 hours interval and lasted for 5 minutes. In the test trial, two objects from both samples 1 and 2 (“old familiar” and “recent familiar” objects, respectively) were arranged in a quadratic shape configuration, so one old object and one recent object were present in a familiar position while the other two were displaced to a new position.

The type of object used as “old” and “recent” was counterbalanced across mice. All objects were made of plastic to prevent material preference and for an easier cleaning to prevent odor cues. The two sets of objects were different in size, form and color. The arena and objects were thoroughly cleaned with 70% ethanol solution after each trial. The time spent by the mice exploring each object was analyzed observationally. Indeed, the basic measure was the time spent by the mice exploring objects during the sample phases and during the test trial. Additionally, two discrimination indexes were calculated for the test trial: an object recognition ratio (total time exploring “old familiar” objects/total time exploration) and a location recognition ratio (total time exploring displaced objects/total time exploration). The time was recorded only when the mice touched the object with its nose or forepaws. Turning around, walking over the object, rearing above the object or

resting close to the object was not deemed to be exploration. Moreover, locomotor activity was also measured with the software Ethovision XT 7.0 (Noldus, The Netherlands).

Behavioral analysis for 12 months transgenic mice

To assess the cognitive impairment of PS1/APP and PS1 tg mice at 12 months of age, an object recognition test was applied to these animals together with WT animals at the same age. The procedure followed was the same as described above for lithium treatment.

6.2.12. Statistical analysis

Data was expressed as mean \pm SD. The comparison between two mice groups was done by two-tailed t-test, and for comparing several groups and ages we used one-way ANOVA, followed by Tukey or Bonferroni post-hoc multiple comparison test (SigmaStat® 2.03, SPSS Inc). For both test, the significance was set at 95% of confidence.

6.3. RESULTS AND DISCUSSION

6.3.1. CHAPTER 1. Early neuronal loss and axonal/presynaptic damage is associated with accelerated amyloid- β accumulation in PS1/APP Alzheimer's disease mice subiculum (Trujillo-Estrada et al., 2014)

Transgenic mice overexpressing mutant familial Alzheimer's disease genes are widely used to study pathology progression and the mechanisms leading to neuronal dysfunction. Neuronal loss is considered as one of the most important pathological hallmarks of Alzheimer disease. The pathogenesis of AD is highly complex and most transgenic models display scarce or delayed neuronal loss concomitant with the accumulation of extracellular/intracellular amyloid-beta. However, we have previously reported selective and significant neuronal loss in the hippocampus proper and the entorhinal cortex of a PS1/APP mouse model. The aim of the present study was to analyze the Abeta associated neuronal vulnerability in the subiculum of this AD model. The subiculum, highly affected in AD, functions as a mediator of hippocampal-cortical interaction and has been proposed to play an important role in the encoding and retrieval of long-term memory.

Our data demonstrated the existence of a progressive SOM-positive interneurons loss since early ages (-27% at 4 months and -64% at 6 months, measured by stereological quantification) compared to age-matched control mice. The number of SOM dystrophies increase with the age. However, PV-positive interneurons cells, which include basket and axon-axonic GABAergic neurons, did not changes at any age tested, showing a resistance to neurodegeneration. Finally, we analyzed principal cells population. The discrimination between interneurons and principal cells was carried out by multiple 5x (SOM, PV, CR,

VIP and NeuN)-immunolabeling. Principal cells show a reduction in numerical density (cells/mm³) at 6 months of age (-28%) in PS1/APP tg mice compared to age-matched control.

Extracellular Abeta deposits as well as intraneuronal accumulation of Abeta was observed as early as 2 month-old and rapidly increased with age, being the subiculum the first cerebral region affected by Abeta pathology. Plaque size increases with age as well. Intracellular Abeta is mostly localized in lysosomal vesicles of principal cells whereas no colocalization was detected between SOM-interneurons and intraneuronal A β . Finally, our data demonstrated the existence of a progressive, age-dependent, formation of axonal/synaptic dystrophies closely associated with the amyloid deposits.

In conclusion, subiculum undergoes the earliest neurodegenerative process in this model, being extracellular Abeta the major causative agent by acting directly and/or indirectly by triggering a neurotoxic inflammation response. Elucidating the basis of this early selective vulnerability will provide valuable insights for understanding the pathogenesis of disease and for evaluating treatments.

6.3.2. CHAPTER 2. Degeneration of basal cholinergic neuron in transgenic models of Alzheimer's disease

Cholinergic system is altered in AD, which has been suggested to cause, at least partly, the cognitive deficits observed, as there is extensive evidence regarding the role of cholinergic system in learning and memory. Central cholinergic system, as well as other neurotransmitter and modulator systems including serotonin, noradrenaline and somatostatin, is differentially altered in brains of individuals with AD. This neuronal vulnerability is poorly understood but it has been hypothesized that Abeta peptides induce neurodegenerative changes at cholinergic terminals. However, it is still a matter of debate whether the degeneration of cholinergic system is a primary event or secondary to the Abeta pathology. This is the reason why we have analyzed the cholinergic system in other transgenic model of the disease carrying APP mutations or not. Here we assessed the temporal course of cholinergic degeneration in different transgenic mouse model of AD: PS1, APP, PS1/APP, PS1d9/APP and TAU.

Cholinergic neurons were immunostained with an antiserum against choline-acetyltransferase (ChAT). Forebrain cholinergic neurons projecting to the hippocampus (medial septum and vertical limb of Broca's diagonal band) and cortex (nucleus basalis of Meynert) and cortical ChAT-interneurons were stereologically counted. We found a significant decrease in the number of cholinergic neurons in basal forebrain (BF) nuclei at 12 months in mice carrying PS1 and TAU mutant gene compared to age-matched control and APP transgenic animals. Then we analyzed the ChAT fiber network in the hippocampus. Here, we detected a loss of suprapyramidal fiber layer in animals with

ChAT cell loss (PS1 and PS1/APP), whereas WT and APP tg mice did not display any change.

There is a marked cholinergic dystrophic pathology in tg animals carrying APP mutations related with Abeta plaque deposition in the hippocampus and cortical areas. These axonal dystrophies accumulated LC3b, LAMP2 and AT8. Surprisingly, these ChAT dystrophies were detected in PS1 tg mice as well. ChAT neurons in the basal forebrain did not over-express APP transgene and did not accumulate Abeta42. Actually, the Abeta plaque deposition in the basal forebrain occurs at advanced ages suggesting a limited impact of Abeta in cell neurodegeneration. These basal forebrain plaques are surrounded by activated microglia and reactive astrocytes. Finally, we demonstrated that 12-month-old PS1 and PS1/APP mice displayed memory deficits measured by object recognition test.

In conclusion, our results suggest an implication of PS1 and/or TAU mutations in the ChAT neuronal vulnerability, as APP transgenic model does not show ChAT cell loss. Therefore, loss of Presenilin or Tau function recapitulates key features in AD, including neuronal loss and progressive memory deficits, suggesting that these mutations may underlie neurodegeneration and dementia in AD. Our model does not diminish the impact of Abeta in the pathogenesis of AD, however we suggest a central role of Presenilin and Tau in the degeneration of cholinergic system.

6.3.3. CHAPTER 3. In vivo modification of Abeta plaque toxicity as a novel neuroprotective lithium-mediated therapy for Alzheimer's disease pathology (Trujillo-Estrada et al., 2013).

Despite the relatively large information about the Alzheimer's disease pathology, no effective disease-modifying treatment has been yet developed. Lithium, a primary drug to treat bipolar disorder, has been suggested as a potential treatment against AD. In this work we have evaluated whether lithium treatment could ameliorate the neuropathology progression of the transgenic PS1_{M146L}/APP_{SL} mice. Unlike most transgenic animals models, which do not exhibit the neurodegenerative spectrum of disease observed in the patient population, this AD model exhibits a prominent amyloid pathology along with a selective and significant neuronal loss in the hippocampus and entorhinal cortex. Therefore, this model is highly valuable for evaluating the effectiveness of potential neuroprotective therapies for AD.

Our data demonstrate that chronic oral administration of lithium, before the pathology onset, ameliorated the degenerative processes and behavioral/memory deficits occurring during disease progression in our PS1/APP model. Specifically, and of great relevance for AD prevention, early lithium intervention was able to arrest neuronal loss in hippocampus and entorhinal cortex of highly vulnerable populations. Besides, lithium reduced the axonal dystrophic pathology. Moreover, a significant lower accumulation of phospho-tau, LC3-II and ubiquitinated proteins was detected.

We detected a reduction of plaque size with lithium treatment. Moreover, lithium treatment increased the compaction of the extracellular plaques and reduced the oligomeric halo of these plaques, reducing, therefore, the plaque toxicity, as lithium plaques are surrounded by a low NPY-labeled dystrophic neurites. Our study highlights that the switch of plaque quality by lithium could be mediated by astrocyte activation and the release of heat shock proteins, which concentrated in the core of the plaques.

Our data demonstrate a novel lithium-mediated mechanism capable of altering the course of the disease in an amyloidogenic AD model. This pharmacological in vivo modulation of the extracellular Abeta plaque compaction/toxicity might represent an innovative therapeutic approach for AD.

6.3.4. CHAPTER 4. Preclinical evaluation in a transgenic AD model of the therapeutic potential of a novel statin

The association between Alzheimer's disease and cholesterol levels has grown in the last decade, and in consequence it has been proposed "the cholesterol hypothesis" for AD. According to this, statin therapy (a treatment for hypercholesterolemia and dyslipidemia) has been proposed as an effective therapeutic approach to stop or slow the neurodegenerative process in AD.

The work presented in this chapter of the Thesis was done in collaboration with the company Neuron Biopharma. This company designed and patented a novel statin (NST0037) since commercial statins decreased plasma cholesterol levels but only few have acceptable blood-brain barrier permeability. Therefore Neuron provided us three groups of PS1/APP animals, two of them treated with this novel statin, and another group of untreated transgenic animals used as control group. The treatment was carried out as described in section 6.2.1 (statin treatment).

In this work, we have shown that the oral administration of this novel statin caused a significant decrease in the amyloid deposition measured by molecular and histological techniques. However, this decrease in Abeta plaques is not due to a change in the plaque size. The reduction in Abeta is probably due to a lower Abeta production.

Then, we analyzed the impact of the statin treatment over the neuron vulnerability and its potential neuroprotective role. We detected a decrease in APP and LC3-b dystrophic pathology in treated animals. Related to SOM-interneurons, we demonstrated a reduction in its dystrophic pathology in treated animals and, most importantly, a reduction in the cell loss with the statin treatment. The protection of SOM neurons might lead to the cognitive improvement observed in the treated groups (data from Neuron Biopharma), as this neuropeptide is related to learning and memory processes. The treatment also reduced the dystrophic ChAT pathology; however, there is no effect over the ChAT neuron loss in the NBM of PS1d9/APP mice.

In conclusion, our results show that treatment with this novel non-commercial statin ameliorates Abeta accumulation and protect vulnerable neurons in a PS1/APP tg model of AD. Since statins have relatively few side effects and are well tolerated by patients, they can be considered as potential drugs for AD treatment.

6.3.5. CHAPTER 5. IL4 deletion accelerates AD-like pathology and induces a proinflammatory response in a transgenic animal model of Alzheimer's disease

Over the past decade neuroinflammation has been a focus of increasing interest in the Alzheimer's disease field not only for its potential role in neuronal degeneration but also as a promising target for new therapies. We have previously demonstrated that microglial cells change their activation phenotype, from neuroprotective (M2) to cytotoxic (M1), during disease progression in a transgenic PS1/APP model. In this sense, in AD there is an increase in pro-inflammatory cytokines with age which is accompanied by a decrease in hippocampal interleukin-4 (IL-4) level. Therefore, modulating the inflammatory pathways in animal models of AD has offered the possibility to investigate the contribution of this process to disease. Here, we have generated an APP mouse knockout for IL-4 (APP/IL4^{-/-}) in order to determinate the implication of this anti-inflammatory cytokine in the disease progression. Accumulating evidences indicate that IL-4 plays a critical role in memory and learning, and it is implicated in tissue reparation and homeostasis through "alternative" macrophage activation.

We found a significant increase in the amyloid deposition in APP/IL4^{-/-} animals compared to age-matched APP mice without change in the plaque size between both genotypes. Microglial cells surrounding Abeta plaques acquire an activated phenotype in APP and APP/IL4^{-/-} tg mice. However, APP/IL4^{-/-} microglia showed an overactivated phenotype in hippocampus and subiculum, characterized by spherical appearance and poorly ramified processes compared to APP microglia. We did not detect changes in astrocytes phenotype.

Besides, regarding to neuronal survival, we detected an increase in the axonal dystrophic pathology in APP/IL4^{-/-} animals, with higher accumulation of APP, phosphorylated tau and ubiquitin dystrophies. Our data demonstrated a deleterious effect of overactivated microglial cells on Abeta pathology in APP/IL4^{-/-}.

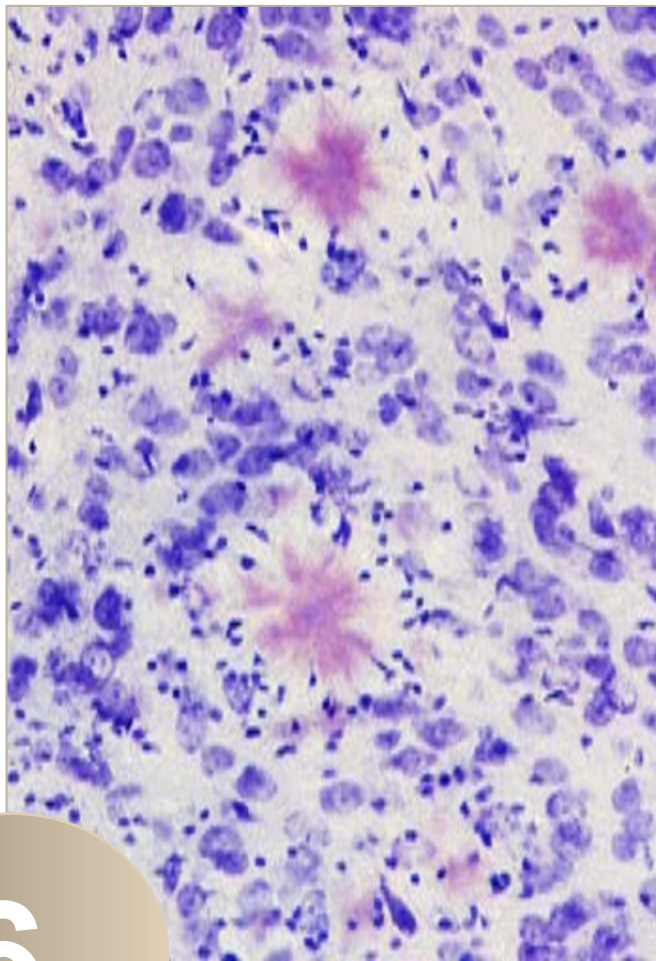
In conclusion, the IL-4 deletion worsens AD in the APP model, causing an increase in amyloid and dystrophic pathology. This increased amyloid load may be due to a change in the microglial phenotype that may lead to a reduction in phagocytosis/removal of amyloid peptide. Furthermore, removal of IL-4 leads to a pro-inflammatory microglial phenotype with increased inflammatory cytokines expression. There is no evidence that the proamiloidogenic effect was due to an alteration in the APP processing. Our results suggest that modulating innate immunity by inducing the IL-4 anti-inflammatory response may be therapeutically relevant for AD.

6.4. REFERENCES

- Agostinho P, Cunha RA, Oliveira C.** (2010). Neuroinflammation, oxidative stress and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des.*, 16(25):2766-2778.
- Araujo F, Tan S, Ruano D, Schoemaker H, Benavides J, Vitorica J.** (1996). Molecular and pharmacological characterization of native cortical gamma-aminobutyric acid(A) receptors containing both alpha(1) and alpha(3) subunits. *J Biol Chem.*, 271:27902-27911.
- Ashe KH, Zahs KR.** (2010). Probing the biology of Alzheimer's disease in mice. *Neuron*, 66:631-645.
- Bagyinszky E, Youn YC, An SS, Kim S.** (2014). The genetics of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging*, 9:535-551.
- Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E.** (2011). Alzheimer's disease. *Lancet*, 377(9770):1019-1031.
- Bilkei-Gorzo A.** (2014). Genetic mouse models of brain ageing and Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther.*, 142(2):244-257.
- Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, Planche M, Canton T, Jedidi I, Gohin M, Wirths O, Bayer TA, Langui D, Duyckaerts C, Tremp G, Pradier L.** (2003). Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with A β deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp Neurol*. 184(1):247-263.
- Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA.** (2010). Alzheimer's Disease. *Dis Mon.*, 56:484-546.
- Chiang K, Koo ED.** (2014). Emerging therapeutics for Alzheimer's Disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 54:381-405.
- Choi SS, Lee SR, Kim SU, Lee HJ.** (2014). Alzheimer's disease and stem cell therapy. *Exp Neurol.*, 23(1):45-52.
- Crews L, Masliah E.** (2010). Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.*, 19(R1):R12-20.
- Davis KE, Easton A, Eacott MJ, Gigg J.** (2013). Episodic-like memory for What-Where-Which occasion is selectively impaired in the 3xTgAD mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimer Dis.* 33:681-698.
- Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC.** (2009). Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol.*, 118:5-36.
- Eskildsen SF, Coupé P, Fonov VS, Pruessner JC, Collins DL; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative.** (2015). Structural imaging biomarkers of Alzheimer's disease: predicting disease progression. *Neurobiol Aging*, 36 Suppl 1:S23-31.
- Filali M, Lalonde R, Theriault P, Julien C, Calon F, Planel E.** (2012). Cognitive and non-cognitive behaviors in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease expressing mutated APP, PS1, and Mapt (3xTg-AD). *Behav Brain Res.*, 234:334-342.
- Franco R, Cedazo-Minguez A.** (2014). Successful therapies for Alzheimer's disease: why so many in animal models and none in humans? *Front Pharmacol*, 5:146.
- Franklin KBJ, Paxinos G.** (2007). The mouse brain in stereotaxic coordinates. Third edition.
- Gomez-Isla T, Price JL, McKeel DW Jr, Morris JC, Growdon JH, Hyman BT.** (1996). Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci.*, 16(14):4491-4500.
- Haass C, Selkoe DJ.** (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 8(2):101-112.
- Hardy JA, Higgins GA.** (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256(5054):184-185.
- Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, Jacobs AH, Wyss-Coray T, Vitorica J, Ransohoff RM, Herrup K, Frautschy SA, Finsen B, Brown GC, Verkhratsky A, Yamanaka K, Koistinaho J, Latz E, Halle A, Petzold GC, Town T, Morgan D, Shinohara ML, Perry VH, Holmes C, Bazan NG, Brooks DJ, Hunot S, Joseph B, Deigendesch N, Garaschuk O, Boddeke E, Dinarello CA, Breitner JC, Cole GM, Golenbock DT, Kummer MP.** (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.*, 14(4):388-405.
- Heppner FL, Roth K, Nitsch R, Hailer NP.** (1998). Vitamin E induces ramification and downregulation of adhesion molecules in cultured microglial cells. *Glia*, 22(2):180-188.
- Huang Y, Mucke L.** (2012). Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell*, 148:1204-1222.
- Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Lee MK, Younkin LH, Wagner SL, Younkin SG, Borchelt DR.** (2004). Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase. *Hum Mol Genet.*, 13:159-170.
- Jimenez S, Baglietto-Vargas D, Caballero C, Moreno-Gonzalez I, Torres M, Sanchez-Varo R, Ruano D, Vizuet M, Gutierrez A, Vitorica J.** (2008). Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *J Neurosci.*, 28(45):11650-11661.

- Jimenez S, Torres M, Vizuete M, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Trujillo-Estrada L, Carmona-Cuenca I, Caballero C, Ruano D, Gutierrez A, Vitorica J.** (2011). Age-dependent accumulation of soluble amyloid beta (Abeta) oligomers reverses the neuroprotective effect of soluble amyloid precursor protein-alpha (sAPP(alpha)) by modulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-GSK-3beta pathway in Alzheimer mouse model. *J Biol Chem.*, 286(21):18414-18425.
- Karran E, Mercken M, De Strooper B.** (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.*, 10(9):698-712.
- Karran E, Hardy J.** (2014). A critique of the drug discovery and phase 3 clinical programs targeting the amyloid hypothesis for Alzheimer Disease. *Ann Neurol.*, 76(2):185-205.
- Latta CH, Brothers HM, Wilcock DM.** (2014). Neuroinflammation in Alzheimer's disease; a source of heterogeneity and target for personalized therapy. *Neuroscience.*
- Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Del Rio JC, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuete M, Vitorica J, Gutierrez A.** (2009). Extracellular amyloid-beta and cytotoxic glial activation induce significant entorhinal neuron loss in Young PS1(M146L)/APP(751SL) mice. *J Alzheimers Dis.*, 18(4):755-776.
- Nasrallah IM, Wolk DA.** (2014). Multimodality imaging of Alzheimer disease and other neurodegenerative dementias. *J Nucl Med.*, 55(12):2003-2011
- Neha, Sodhi RK, Jaggi AS, Singh N.** (2014). Animal models of dementia and cognitive dysfunction. *Life Sci.*, 109(2):73-86.
- Perl DP.** (2010). Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med.*, 77:32-42
- Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP.** (2013). The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement.*, 9(1):63-75.e2.
- Rajendran L, Annaert W.** (2012). Membrane trafficking pathways in Alzheimer's Disease. *Traffic*, 13(6):759-770.
- Ramos B, Baglietto-Vargas D, del Rio JC, Moreno-Gonzalez I, Santa-Maria C, Jimenez S, Caballero C, Lopez-Tellez JF, Khan ZU, Ruano D, Gutierrez A, Vitorica J.** (2006). Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1xAPP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 27(11):1658-1672.
- Reiman EM, Caselli RJ.** (1999). Alzheimer's disease. *Maturitas*, 31(3):185-200.
- Schindowski K, Bretteville A, Leroy K, Bégard S, Brion JP, Hamdane M, Buée L.** (2006). Alzheimer disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits. *Am J Pathol.*, 169(2):599-616.
- Schneider LS, Mangialasche F, Andreasen N, Feldman H, Giacobini E, Jones R, Mantua V, Mecocci P, Pani L, Winblad B, Kivipelto M.** (2014). Clinical trials and late-stage drug development for Alzheimer's disease: an appraisal from 1984 to 2014. *J Intern Med.*, 275(3):251-283.
- Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT.** (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, 1(1):a006189.
- Trujillo-Estrada L, Jimenez S, De Castro V, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Navarro V, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Davila JC, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J.** (2013). In vivo modification of Abeta plaque toxicity as a novel neuroprotective lithium-mediated therapy for Alzheimer's disease pathology. *Acta Neuropathol Commun.*, 12;1(1):73.
- Trujillo-Estrada L, Dávila JC, Sánchez-Mejias E, Sánchez-Varo R, Gomez-Arboledas A, Vizuete M, Vitorica J, Gutiérrez A.** (2014). Early neuronal loss and axonal/presynaptic damage is associated with accelerated amyloid- β accumulation in A β PP/PS1 Alzheimer's disease mice subiculum. *J Alzheimers Dis.*, 42(2):521-541.
- Van Strien NM, Cappaert NL, Witter MP.** (2009). The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci.*, 10(4):272-282.
- Webster SJ, Bachstetter AD, Nelson PT, Schmitt FA, Van Eldik LJ.** (2014). Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front Genet.*, 5(88):1-23.
- West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC.** (1994). Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet*, 344(8925):769-772.
- Whitehouse PJ, Price DL, Clark AW, Coyle JT, DeLong MR.** (1981). Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann Neurol.*, 10(2):122-126.
- Yamada K, Nabeshima T.** (2000). Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharmacol Ther.*, 88:93-113.
- Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H.** (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain*, 4:3.

6.



Anexos

Anexo 1

Trujillo-Estrada L, Dávila JC, Sánchez-Mejias E, Sánchez-Varo R, Gomez-Arboledas A, Vizuite M, Vitorica J, Gutiérrez A. (2014). Early neuronal loss and axonal/presynaptic damage is associated with accelerated amyloid- β accumulation in A β PP/PS1 Alzheimer's disease mice subiculum. *J Alzheimers Dis.*, 42(2):521-541.

Early Neuronal Loss and Axonal/Presynaptic Damage is Associated with Accelerated Amyloid- β Accumulation in A β PP/PS1 Alzheimer's Disease Mice Subiculum

Laura Trujillo-Estrada^{a,c}, José Carlos Dávila^{a,c}, Elisabeth Sánchez-Mejías^{a,c}, Raquel Sánchez-Varo^{a,c}, Angela Gomez-Arboledas^{a,c}, Marisa Vizuete^{b,c,d}, Javier Vitorica^{b,c,d,*} and Antonia Gutiérrez^{a,c,*}

^a*Department Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Universidad de Málaga, Spain*

^b*Department Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Spain*

^c*Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Spain*

^d*Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS)-Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Spain*

Handling Associate Editor: Javier S. Burgos Muñoz

Accepted 10 April 2014

Abstract. The progressive cognitive decline leading to dementia in Alzheimer's disease (AD) patients is the consequence of a severe loss of synapses and neurons affecting particular cell subpopulations in selected brain areas, with the subiculum being one of the earliest regions displaying severe atrophy and pathology. The lack of significant neuronal loss in most AD models is, in fact, the major shortcoming for the preclinical evaluation of drugs that could have greater potential in patients to alleviate or prevent this disease. In this study, using immunohistochemical and stereological approaches, we have analyzed the histopathological events in the subiculum of A β PP751SwedLondon/PS1M146L mice, a transgenic model that displays neuronal vulnerability at early ages in hippocampus and entorhinal cortex. Our results indicate that the subiculum is the earliest affected region in the hippocampus, showing a selective early loss of both principal neurons (28%) and SOM-positive interneurons (69%). In addition, our data demonstrate the existence of an early axonal and synaptic pathology, which may represent the beginning of the synaptic disruption and loss. These neurodegenerative processes occur in parallel, and closely related, with the onset and accelerated progression of the extracellular amyloid- β deposition, thus suggesting plaques as major contributors of neuronal/axonal damage. Data reported here indicate that this AD model displays a selective AD-like neurodegenerative phenotype in highly vulnerable regions, including the subiculum, and therefore can be a very useful model for testing the therapeutic ability of potential compounds to protect neurons and ameliorate disease symptoms.

Keywords: Alzheimer's disease, amyloid- β plaques, axonal damage, hippocampus, neuronal loss, subiculum, transgenic mice

*Correspondence to: Javier Vitorica, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla, Spain. Tel.: +34 955923053; Email: vitorica@us.es; Antonia Gutiérrez, Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071 Málaga, Spain. Tel.: +34 952133344; E-mail: agutierrez@uma.es.

¹These authors are co-senior authors.

INTRODUCTION

The progressive cognitive decline that ultimately leads to dementia in Alzheimer's disease (AD) is consequence of a severe loss of synapses and neurons that selectively affects particular cell subpopulations in brain areas critical for learning and memory [1–6]. Although transgenic mice, based on the overexpression of proteins harboring one or several mutations found in familial AD, progressively develop amyloid- β (A β) deposits and tau hyperphosphorylation, along with dystrophic neurites and activated astrocytes and microglia, very limited or no neuronal death has been reported in vulnerable brain areas of these AD models [7–10]. This lack of significant neuronal loss is, in fact, the major shortcoming of AD models for the preclinical evaluation of drugs that could have greater potential in patients to alleviate or prevent this disease. Therefore, the characterization of the neurodegenerative phenotype of AD models is a critical step in ensuring success for translating therapeutic efficacy.

The hippocampal formation, a key structure of the medial temporal lobe memory system and one of the earliest regions to be affected in AD, consists of a number of subdivisions including the dentate gyrus, the hippocampus proper (areas CA1 and CA3), the entorhinal cortex, and the subiculum [11–13]. Marked neuronal reduction occurs in the hippocampal formation of AD patients [14–21]. Even in mild AD, a marked neuronal loss can be found in the entorhinal cortex and hippocampus [2, 4], and these changes result in decreased volume of these brain areas [22, 23]. Unlike most transgenic animal models, which do not exhibit the neurodegenerative spectrum of disease observed in the patient population, in the A β PP751SweLondon/PS1M146L (A β PP/PS1) mice we have previously reported a selective and significant neuronal loss in the hippocampus proper, dentate gyrus, and entorhinal cortex. Subpopulations of GABAergic interneurons were selectively affected at early ages in hippocampal CA fields and dentate gyrus [24, 25] as well as entorhinal cortex [26]. However, pyramidal neurons were first affected in entorhinal cortex [26] and then later in CA1 hippocampus [27], similarly to the pathological pattern described in patients [2, 28, 29]. The loss of these neurons was associated with the prominent extracellular amyloid pathology along with the age-dependent increase in the soluble oligomeric A β content and/or the induced cytotoxic inflammatory response [27, 30].

In contrast to the rest of the hippocampal formation, the subiculum has received comparatively little

investigation in the AD field. The subiculum is the principal target of the CA1 pyramidal cells and serves as the major output structure of the hippocampal formation to widespread subcortical and cortical areas (for review, see [31]). In AD patients, the subiculum is among the earliest regions displaying severe atrophy and pathology [1, 16, 18, 32–37]. Loss of the subicular neurons has been reported to be associated with clinical AD [19, 21]. Thus, damaged hippocampal–cortical and hippocampal–subcortical communication might be significant for the memory impairment seen in patients. In AD models, tremendous attention has been focused on hippocampal (CA fields and dentate gyrus) pathology, however very few studies comment specifically on subiculum neurodegeneration so far [38, 39].

Here we have characterized the histopathological events in the subiculum of the A β PP751SweLondon/PS1M146L model by immunohistochemistry and stereological approaches to detect changes in the number of neurons. Our data indicate that the subiculum is the earliest affected hippocampal region showing a selective loss of both principal cells and SOM-positive interneurons at an early age (4–6 months) in parallel with an early onset of extracellular amyloid deposits and prominent axonal damage. The most relevant feature of this model is the selective AD-like neurodegenerative phenotype in highly AD-vulnerable regions. Therefore, this model can be very useful for testing the therapeutic ability of potential compounds to protect neurons and ameliorate disease symptoms due to this neurodegenerative phenotype.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male transgenic mice expressing familial AD-causing mutations in the A β PP and PS1 genes were used in this study [40]. The bigenic mice were obtained by crossing homozygous mice expressing human mutant PS1M146L (under HMG-CoA reductase promoter) to hemizygous mice expressing human mutant A β PP751 carrying the Swedish (KM670/671NL) and London (V717I) mutations (under the control of the Thy1 promoter). Mice represented F6–F10 offspring of heterozygous transgenic mice. Non-transgenic mice (WT) of the same genetic background (C57BL/6) and age were also used. All animal experiments were carried out in accordance with the European Union regulations (Council Directive 86/609/ECC of November 24th, 1986) and approved by the committee of

animal use for research at Malaga University, Spain (RD 1201/2005 of October 10th, 2005).

Tissue preparation

After deep anesthesia with sodium pentobarbital (60 mg/kg), 2, 4, 6, 12 and 18-month-old, A β PP/PS1, PS1, and WT mice ($n=6$ /age/genotype) were perfused transcardially with 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 followed by 4% paraformaldehyde, 75 mM lysine, 10 mM sodium metaperiodate in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. Brains were then removed, post-fixed overnight in the same fixative solution at 4°C, cryoprotected in 30% sucrose, sectioned at 40 μ m thickness in the coronal plane on a freezing microtome, and serially collected in wells containing cold PBS and 0.02% sodium azide (each series contained sections that represented 1/7th of the total brain).

Immunohistochemistry

Serial sections from A β PP/PS1, PS1, and WT mice were assayed simultaneously for light and confocal microscopy immunohistochemistry using same batches of solutions to minimize variability in immunolabeling conditions as previously reported [24–26, 41]. Free-floating sections were first pre-treated with 3% H₂O₂/3% methanol in PBS pH 7.4 for 20 min to inhibit endogenous peroxidase, and then with avidin- biotin Blocking Kit (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) for 30 min to block endogenous avidin, biotin and biotin-binding proteins. For single immunolabeling, sections were incubated overnight at room temperature with one of the following primary antibodies: anti-somatostatin (SOM) goat polyclonal (1:1000 dilution; Santa Cruz Biotechnology); anti-parvalbumin (PV) rabbit polyclonal (1/5000 dilution, Swant); anti-human amyloid- β protein precursor (hA β PP) rabbit polyclonal (1/20000; Sigma) or goat polyclonal (1/20000; Meridian life sciences); anti-A β mouse monoclonal 6E10 (1:1500 dilution; Sigma); anti-A β ₄₂ rabbit polyclonal (1/5000; Millipore); anti-oligomeric A β (OC) rabbit polyclonal (1/5000; Millipore); anti-synaptophysin (Syn) rabbit polyclonal (1:1000 dilution; Abcam); anti-MAP-2 rabbit polyclonal (1/5000 dilution; Chemicon); anti-neurofilament rabbit polyclonal (1/5000 dilution; Chemicon), anti-VGluT1 guinea pig polyclonal (1/10000 dilution; Chemicon); anti-VGAT guinea pig polyclonal (1/5000 dilution; Calbiochem); anti-LC3 rabbit polyclonal (1/1000 dilution; Cell Signaling);

anti-ubiquitin rabbit polyclonal (1/5000 dilution; Dako); anti-phospho-tau (AT8) mouse monoclonal (1/250 dilution; Pierce); anti-cathepsin D (Cat-D) goat polyclonal (1/100 dilution; Santa Cruz Biotechnology); anti-choline acetyltransferase (ChAT) goat polyclonal (1/1000 dilution; Millipore) over 24, 48, or 72 h at room temperature. To retrieve intracellular A β , sections were pre-treated for 7 min with 85% formic acid before incubation with the anti-A β antibodies. For general antigen retrieval method sections were previously heated at 80°C for 20 min in 50 mM citrate buffer pH 6.0. The tissue-bound primary antibody was detected by incubating with the corresponding biotinylated secondary antibody (1:500 dilution, Vector Laboratories), and then followed by 1:2000 streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (Sigma Aldrich). The peroxidase reaction was visualized with 0.05% 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), 0.03% nickel ammonium sulphate, and 0.01% hydrogen peroxide in PBS. Specificity of the immune reactions was controlled by omitting the primary antisera. After DAB, some immunolabeled sections were incubated 3 min in a solution of 20% of Congo red. Sections were then mounted onto gelatin-coated slides, dehydrated in graded ethanol, cleared in xylene and coverslipped with DPX (BDH) mounting medium.

For double A β ₄₂/Cat-D, A β ₄₂/hA β PP, A β ₄₂/Syn, hA β PP/SOM, or hA β PP/VGluT1 immunofluorescence labeling, sections were first sequentially incubated with the indicated primaries antibodies followed by the corresponding Alexa488/568 secondary antibodies (1:1000 dilution; Invitrogen). Sections were examined under a confocal laser microscope (Leica SP5 II).

For pyramidal cell discrimination, we used a 5 \times immunohistochemical approach previously reported [26]. Sections were first and sequentially incubated with the following interneuron markers: anti-SOM goat polyclonal (1:1000, Santa Cruz), anti-Calretinin (CR) rabbit polyclonal (1:5000 dilution; Swant), anti-VIP rabbit polyclonal (1:5000 dilution, Acris), anti-PV rabbit polyclonal (1/5000 dilution, Swant) as described above. After the DAB-nickel reaction (dark blue end product), sections were then incubated 3 days with the neuronal marker anti-NeuN monoclonal antibody (1:1000 dilution; Chemicon). The second immunoperoxidase reaction was developed with DAB only (brown reaction end product). The appropriate controls were performed to avoid any false positive immunostaining due to cross-reactivity between detection systems. To clearly discriminate the different streptavidin-

peroxidase reactions, the first one (for interneurons) was always developed with DAB-nickel (dark blue) solution whereas the second one (NeuN) only with DAB (light brown). Moreover, the different compartment localization of interneuron (cytoplasm) and NeuN (nuclei) epitopes completely guarantee the correct non-overlapped visualization of both reactions and the interpretation of the results.

Thioflavin-S staining

Free-floating sections were incubated for 5 min with 0.015% Thio-S (Sigma) in 50% ethanol, and then washed in 50% ethanol, in PBS, mounted onto gelatin coated slides and coverslipped with 0.1 M PBS containing 50% glycerin and 3% triethylenediamine.

Plaque loading quantification

Plaque loading was defined as percentage of total subicular area stained for A β . Quantification of extracellular A β content was performed as previously reported [26]. Thioflavin-S staining was examined under an Olympus BX-61 epifluorescent microscope using FITC filter and 4 \times objective. Images were acquired with an Olympus DP71 high-resolution digital camera using the Cell-A program (Olympus). The camera settings were adjusted at the start of the experiment and maintained for uniformity. Digital images (4 sections/mouse) from 2, 4, 6, and 12-month old A β PP/PS1 mice ($n=4/\text{age}$) were analyzed using Visilog 6.3 analysis program (Noesis, France). The plaque area (Thioflavin-S positive) within the subiculum was identified by level threshold which was maintained throughout the experiment for uniformity. The color images were converted to binary images with plaques. The subicular area in each 4 \times image was manually outlined. The plaque loading (%) for each transgenic mouse was estimated and defined as (sum plaque area measured/sum subicular area analyzed) \times 100. The sums were taken over all slides sampled and a single plaque burden was computed for each mouse. The mean and standard deviation (SD) of the plaque loading were determined using all the available data. Quantitative comparisons were carried out on sections processed at the same time with same batches of solutions.

Plaque size morphometric analysis

Four coronal sections stained with Thioflavin-S from 2 ($n=5$), 4 ($n=5$), 6 ($n=5$), and 12-month-old

($n=5$) A β PP/PS1 mice were analyzed using the nucleator method with isotropic probes by the NewCAST software package from Olympus stereological system. Subiculum was analyzed using a counting frame of 6022.8 μm^2 and step length of 173.53 μm . For individual plaque measurement, a 40 \times objective was used. Number of plaques/ mm^2 falling into four surface categories (ranging from <200 μm^2 to >2000 μm^2) was calculated. Each analysis was done by a single examiner blinded to sample identities.

Stereological analysis

Immunopositive cells for SOM, PV, or NeuN belonging to the different animal groups (WT, PS1, and A β PP/PS1) and ages (2, 4, 6, 12, or 18 months) were quantified ($n=5-6/\text{age}/\text{group}$). Briefly, the quantitative analyses were performed using an Olympus BX61 microscope interfaced with a computer and a Olympus DP71 digital camera, and the NewCAST (Computer Assisted Stereological Toolbox) software package (Olympus, Denmark). The number of neurons was quantified in every 7th section (with a distance of 280 μm between sections) through the rostrocaudal extent of the subiculum (between -2.46 mm anterior and -4.60 mm posterior to Bregman coordinates, according to the atlas of Franklin and Paxinos [42]). An average of 6-7 sections was measured in each animal. The subicular area was defined using a 4 \times objective and the number of neurons was counted using a 100 \times /1.35 objective. We used a counting frame of 902.52 μm^2 with step lengths of 46.98 μm for SOM and 95 μm for NeuN counting. The numerical density (ND; cells/ mm^3) was estimated using the following formula: $\text{ND} = Q/(\Sigma A \cdot h)$, where 'Q' is the number of dissector-counted somatic profiles, ' ΣA ' is the area of the counting frame, and 'h' is the height of the optical dissector (10 μm). The precision of the individual estimations is expressed by the coefficient of error (CE) [43] calculated using the following formula: $\text{CE} = 1/Q \times (3A - 4B + C/12) / 2$, where $A = \Sigma Q_i$, $B = \Sigma Q_i \times Q_{i+1}$, $C = \Sigma Q_i \times Q_{i+2}$. The CEs ranged between 0.07 and 0.1. An investigator who was blind to the experimental conditions (age, genotype, and marker) performed neuronal profile counting.

Co-localization analysis

Double immunopositive subicular cells for A β_{42} and Cat-D or for A β_{42} and hA β PP were analyzed to determine the extent of colocalization between both couple of markers in 2 month-old A β PP/PS1

animals. Confocal images of $1,024 \times 1,024$ pixels were acquired by using a Leica SP5 II confocal microscope and a $40\times$ objective. A total of 30 (A β_{42} /Cat-D) to 50 (A β_{42} /hA β PP) cells were randomly photographed ($n=3$). Laser settings were adjusted at the start of the experiment and maintained for uniformity. Images were analyzed using LAS AF Lite program (Leica). For A β_{42} /Cathepsin-D quantification we considered the number of A β_{42} points that were cathepsin-D positives. For A β_{42} /hA β PP quantification, we determined the area of A β_{42} which co-localized with hA β PP.

Electron microscopy

Fixed brains (see above) from 4–6 month-old mice were sectioned at $50\ \mu\text{m}$ or $250\ \mu\text{m}$ thickness in the coronal plane on a vibratome (Leica VT1000S) and serially collected in wells containing cold PB and 0.02% sodium azide. For standard electron microscopy, the $250\ \mu\text{m}$ -thick sections were postfixed in 1% osmium tetroxide in 0.1 M PB, block stained with uranyl acetate, dehydrated in acetone, and flat embedded in Araldite (EMS, USA). Selected areas were cut in ultrathin sections and examined with an electron microscope (JEOL JEM1400).

For the immunogold labeling, the $50\ \mu\text{m}$ sections were first washed with PBS and incubated in a 50 mM glycine solution 5 min in order to increase the antibody binding efficiency. Following the standard immunohistochemical protocol, the tissue was incubated 48 h in primary rabbit polyclonal antibody anti-A β (1/5000; Millipore) in a PBS 0.1M/0.02% Tx-100/1% BSA solution at 22°C . Then, sections were washed in PBS, and incubated with 1.4 nm gold-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:100; Nanoprobes) overnight at 22°C . After postfixing with 2% glutaraldehyde and washing with 50 mM sodium citrate, the labelling was enhanced with the HQ SilverTM Kit (Nanoprobes), and gold toned. Finally, the immunolabeled sections were processed as above by the osmium fixation, dehydration and embedding steps. In negative control experiments, the primary antibody was omitted.

Statistical analysis

Data was expressed as mean \pm SD. The comparison between two mice groups (WT and A β PP/PS1 mice or PS1 and A β PP/PS1 transgenic mice) was done by two-tailed *t*-test, and for comparing several groups (WT, PS1, and A β PP/PS1 mice) and ages, we used one-way ANOVA, followed by Tukey *post-hoc* multiple comparison test (SigmaStat[®] 2.03, SPSS Inc).

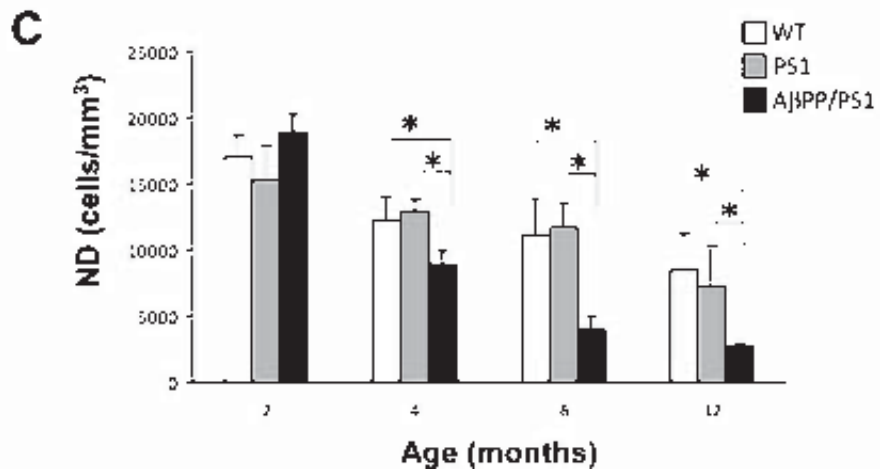
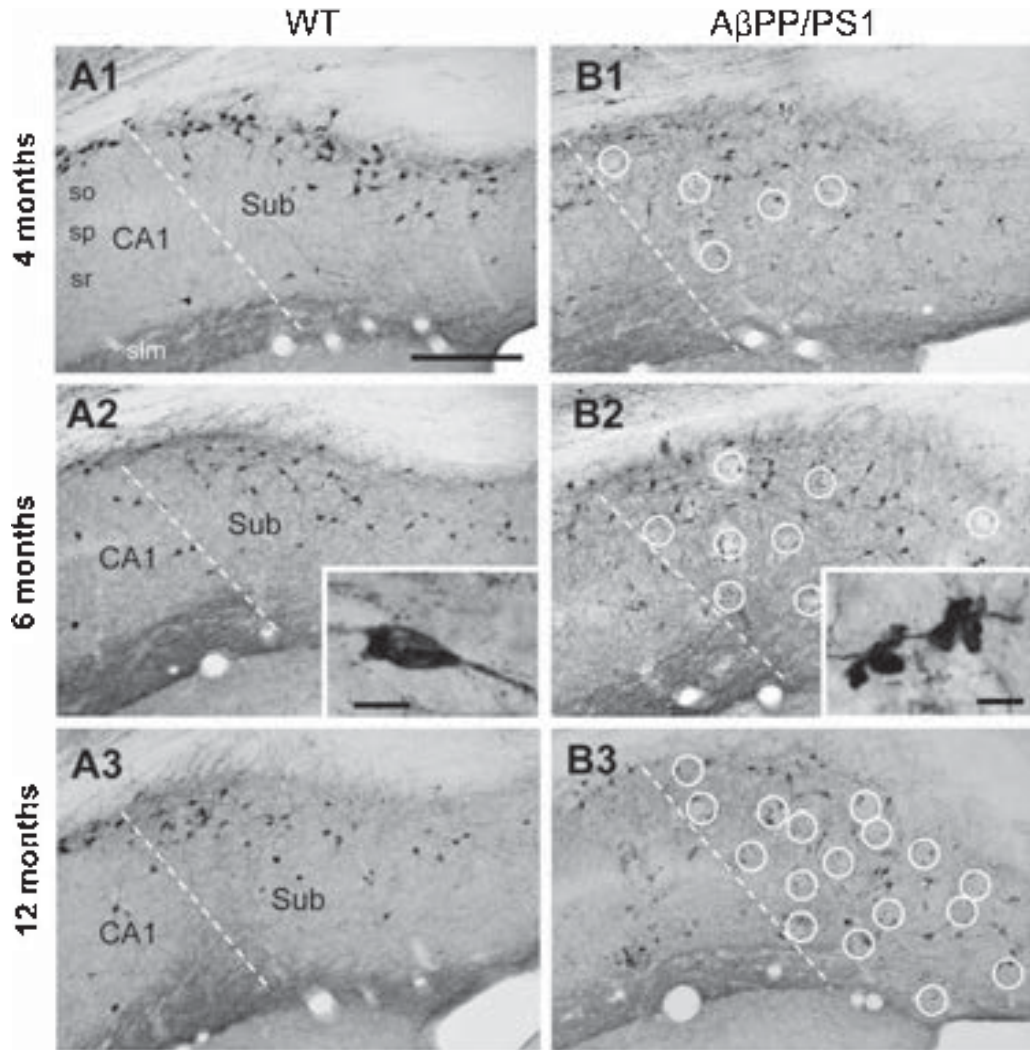
In both cases, the significance was set at 95% of confidence.

RESULTS

Selective loss of subicular interneurons at early ages

We have first determined the numerical density of SOM-immunostained neurons in the subiculum (including pro-subiculum) of A β PP/PS1 at 2, 4, 6 and 12 months of age and compared to age-matched PS1 and WT mice. The initial immunohistochemical analysis showed that the majority of subicular SOM-containing cells were located in the deep pyramidal cell layer and in the polymorphic layer (Fig. 1A1–A3). These interneurons (see inset in Fig. 1A2), corresponding to O-LM cells of hippocampal sector CA1, innervate the distal apical dendrites of pyramidal neurons in the outer molecular layer which receives the main excitatory input from layer III of the medial entorhinal cortex. WT and PS1 animals displayed a similar pattern of SOM-immunolabeling. However, A β PP/PS1 mice (Fig. 1B1–B3) showed a reduced number of labeled somata since early ages (4–6 months) and the presence of numerous SOM-positive dystrophic neurites (see inset in Fig. 1B2), mostly located around amyloid plaques. The stereological study (Fig. 1C) demonstrated a significant decrease ($27.17 \pm 8.50\%$, Tukey $p < 0.05$) in the numerical density (neurons/ mm^3) of SOM-positive cells in A β PP/PS1 mice at 4 months of age compared to age-matched WT group. This decrease was much more marked at 6 months of age ($69.37 \pm 8.53\%$, Tukey $p < 0.05$). No further decrease was detected at 12 month-old ($69.15 \pm 3.05\%$, Tukey $p < 0.05$). PS1 group did not show changes respect to WT group at any age tested. These data were in line with our previous reports showing a significant loss of SOM interneurons in the hippocampus proper (CA1–CA3 and dentate gyrus) and entorhinal cortex of our A β PP/PS1 model at 6 months of age [25, 26].

We have also analyzed whether another major interneuron population, the cells expressing the calcium binding protein parvalbumin (PV) which include basket and axo-axonic GABAergic neurons, was also early affected in the subiculum of our AD model. PV-positive interneurons were present throughout the principal cell layer of the subiculum (Fig. 2A–B). We have not found significant differences in the numerical density (Fig. 2C) of this GABA population at 6 months of age between A β PP/PS1 (8415.58 ± 1429.79) and



WT (10721.93 ± 3057.86) mice and neither at the advanced age of 18 month-old (7556.79 ± 1033.90 versus 9136.28 ± 1205.44 for A β PP/PS1 and WT mice, respectively). Moreover, and unlike SOM-cells, the neuronal population positive for PV did not develop dystrophic neurites with the progression of age. In fact, even the PV-immunopositive processes and somata that were located in the very near proximity of amyloid plaques displayed a normal morphology (see Fig. 2B2).

These findings indicated that in the subiculum of this AD model the SOM interneurons, but not the PV-cells, were highly vulnerable at the initial stages of the disease and that the degenerative process of the SOM population preceded the observed in the hippocampus and entorhinal cortex.

Loss of subicular principal neurons at early ages

Though in this AD model the loss of hippocampal principal neurons is a late event (17–18 months of age) [27, 44], in the entorhinal cortex pyramidal neurodegeneration begins at an early age (6 months) [26]. Therefore, we next examined whether subicular principal neurons were also affected early by determining their numerical density at 2 and 6 months of age in comparison with age-matched PS1 and WT animals. To specifically distinguish principal cells from interneurons, we have performed a multiple immunoperoxidase labeling approach as previously reported ($5 \times$ immunolabeling) [26]. Principal cells were discriminated by a single NeuN-nuclei labeling in light brown color whereas interneurons (those expressing SOM/PV/CR/VIP alone or in combination) displayed also a dark-blue cytoplasmic labeling (see Fig. 3 and for details see insets).

As shown in Fig. 3, the microscopic observation of the $5 \times$ immunolabeled sections at 2 and 6 months of age revealed no qualitative differences in the immunostaining pattern and cell distribution between A β PP/PS1 and PS1 or WT animals. Small rounded areas devoid of cells and characterized by the presence

of dystrophic neurites (in this case only GABAergic dystrophies), which corresponded to areas occupied by amyloid plaques, were easily detected in A β PP/PS1 animals, few plaques at 2 months (Fig. 3A3) and more numerous at 6 months of age (Fig. 3B3), as expected. The quantitative stereological study (Fig. 3C) revealed a significant ($-28.04 \pm 11.76\%$; $p < 0.05$) principal cell loss in A β PP/PS1 mice (compared to PS1 and non-transgenic littermates) at 6 months of age. No differences were detected at 2 months of age. These data demonstrated that principal subicular neurons were vulnerable at early ages and the first hippocampal pyramidal neurons to be affected by the course of the disease.

Accelerated intra- and extracellular A β accumulation in the subiculum

Considering the toxic effect of A β accumulation on neuronal survival we next investigated the temporal intra/extracellular expression of A β in the subiculum of the double transgenic model from 2 to 12 months of age by A β_{42} immunohistochemistry (Fig. 4). Similar results were obtained with the OC antibody for the oligomeric forms of A β (results not shown). As shown in the panoramic images (Fig. 4A–C), the subiculum is one of the earliest forebrain regions to express and accumulate A β . At 2 months of age the presence of intracellular A β was clearly seen in subicular neurons which presented a strong punctuate immunolabeling (Fig. 4A, D, and for a detail see inset in D). We did not check in younger animals, but most probably the intracellular A β accumulation in subiculum started before 2 months of age. The formation of extracellular A β deposits was also first observed in this area at 2 months of age; however the number of plaques was really low indicating that the onset of extracellular amyloid pathology was at the initial stage. At 4 months, numerous plaques were already formed in the subiculum (Fig. 4E) and further on the number and size of these deposits significantly increased, as shown here for 6 and 12 months of age (Fig. 4F and G, respectively). As

Fig. 1. Significant reduction of subicular SOM-interneurons in A β PP/PS1 mice at early ages. Light microscopy images of SOM immunoreactivity in the subiculum of WT (A1–A3) and A β PP/PS1 (B1–B3) mice at 4, 6 and 12 months of age. SOM-positive neurons were located in the deep pyramidal cell layer and in the polymorphic layer (an immunoreactive neuron is shown at higher magnification in A2 inset). A decrease in the number of immunoreactive somata was observed in A β PP/PS1 mice. Abundant immunoreactive dystrophic neurites (higher magnification detail is shown in B2 inset) were seen associated to amyloid plaques (indicated with open white circles) in the double transgenic mice. The number of dystrophies clearly increased with age. Stereological quantification (C) of SOM-positive neurons in WT, PS1, and A β PP/PS1 mice at 2, 4, 6 and 12 months of age ($n = 4$ per genotype and age). Results showed a significant decrease in the density of SOM-immunoreactive somata (cells/mm³) in A β PP/PS1 mice compared to WT-PS1 since 4 months of age. Data (mean \pm SD) was analyzed by one-way ANOVA $p < 0.01$ ($F(14,24) = 24,3$), followed by Tukey *post-hoc* multiple comparison test. Significance ($*p < 0.05$) was indicated in the figure. No differences were detected between PS1 and WT animals. Scale bars, A1–A3 and B1–B3, 200 μ m; insets 14 μ m.

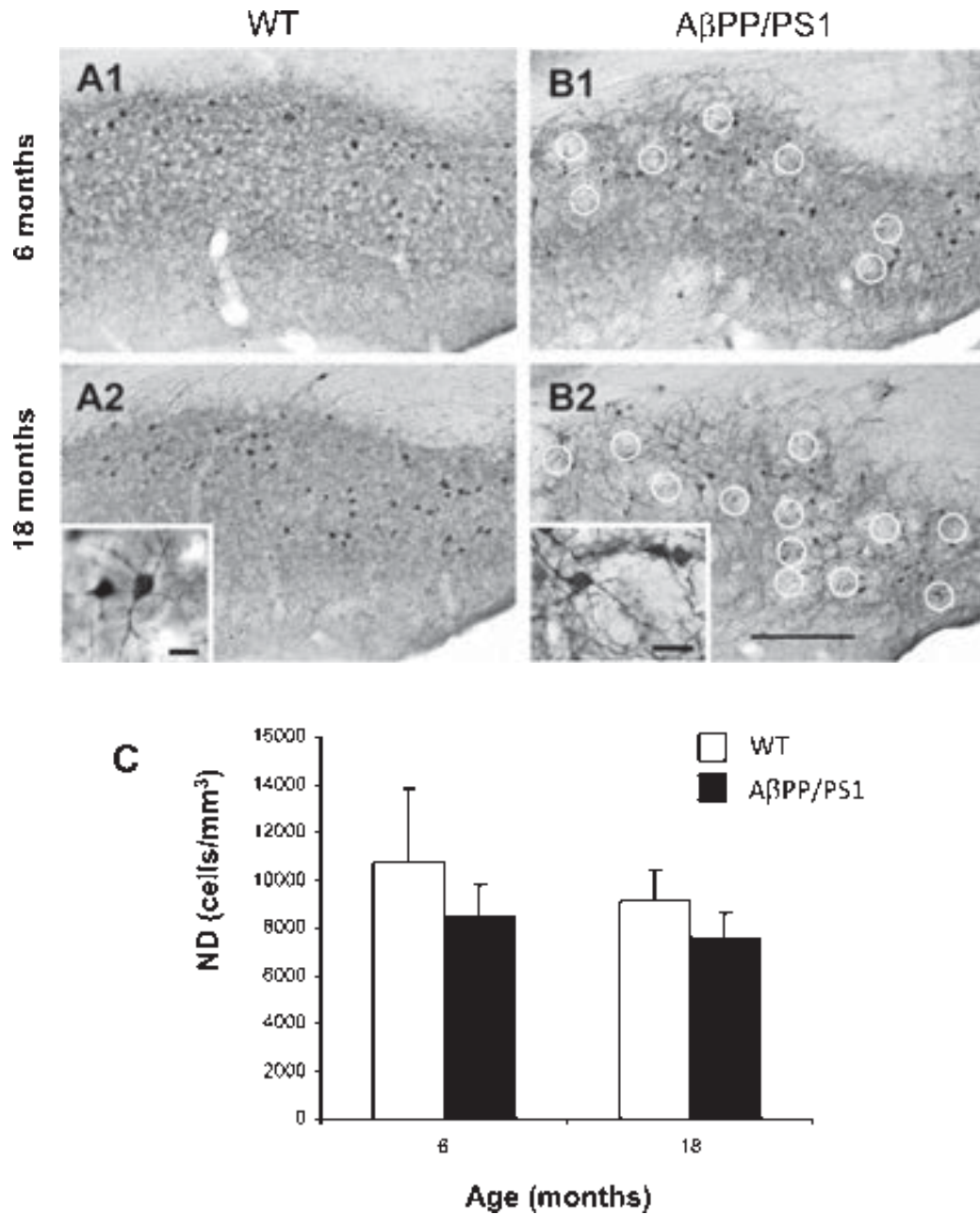


Fig. 2. PV-interneurons are resistant to neurodegeneration in A β PP/PS1 subiculum. Light microscopy images of PV immunoreactivity in the subiculum of WT (A1 and A2) and A β PP/PS1 (B1 and B2) at 6 and 18 months of age. No changes were detected between both genotypes in the number and morphology of these inhibitory neurons. Immunolabeled PV-neurons are shown at higher magnification in A2 inset. PV-neurons located near A β plaques in A β PP/PS1 mice displayed normal morphology as shown in B2 inset. Open white circles indicate areas occupied by A β plaques (not stained) in A β PP/PS1 subiculum. Stereological quantification (C) of PV-positive neurons (cells/mm³) at 6 and 18 months of age in WT and A β PP/PS1 mice revealed no significant differences between the genotypes at the two ages examined. Scale bars, A1, A2, B1 and B2, 200 μ m; insets 14 μ m.

rapidly increased the extracellular accumulation of A β the presence of intraneuronal A β in the somata tended to decrease. In fact, it was really difficult to distinguish A β -positive somata at light microscopy from 6 months

onward due to the high amount of extracellular amyloid deposits occupying the subiculum.

To quantitatively compare the extracellular amyloid progression with age in the subiculum with other

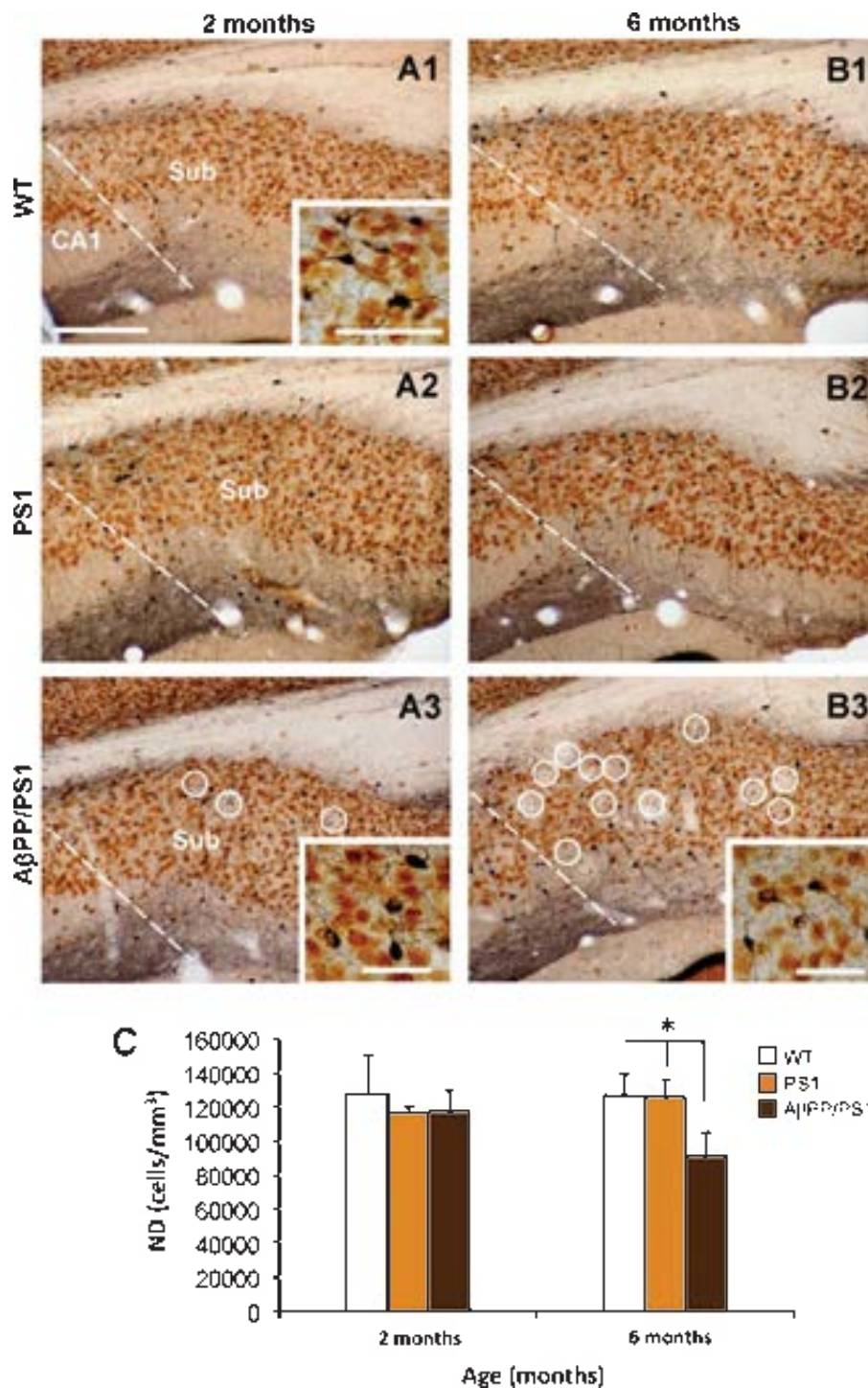


Fig. 3. Loss of principal neurons in the A β PP/PS1 subiculum at early ages. Multiple 5 \times (SOM, PV, CR, VIP and NeuN)-immunolabeling in the subiculum, of WT (A1 and B1), PS1 (A2 and B2), and A β PP/PS1 (A3 and B3) mice at 2 and 6 months of age. Principal neurons (single NeuN-labeled cells in brown color) were immunohistochemically differentiated from interneurons (SOM/PV/CR/VIP-labeled cells in dark blue color) as seen in the higher magnification images of the insets. Stereological counts (C) of principal cells revealed a significant (two tailed t -test, $p < 0.05$) decrease in the density (neurons/mm³) of this cell population in the A β PP/PS1 subiculum compared to age-matched WT or PS1 mice at 6 months of age. No differences were found at 2 months of age. Data are given as mean + SD. Open white circles indicated amyloid plaques location in the A β PP/PS1 subiculum. Scale bars, A1–A3 and B1–B3, 200 μ m; insets in A1 and A3, 100 μ m; inset in B3, 50 μ m.

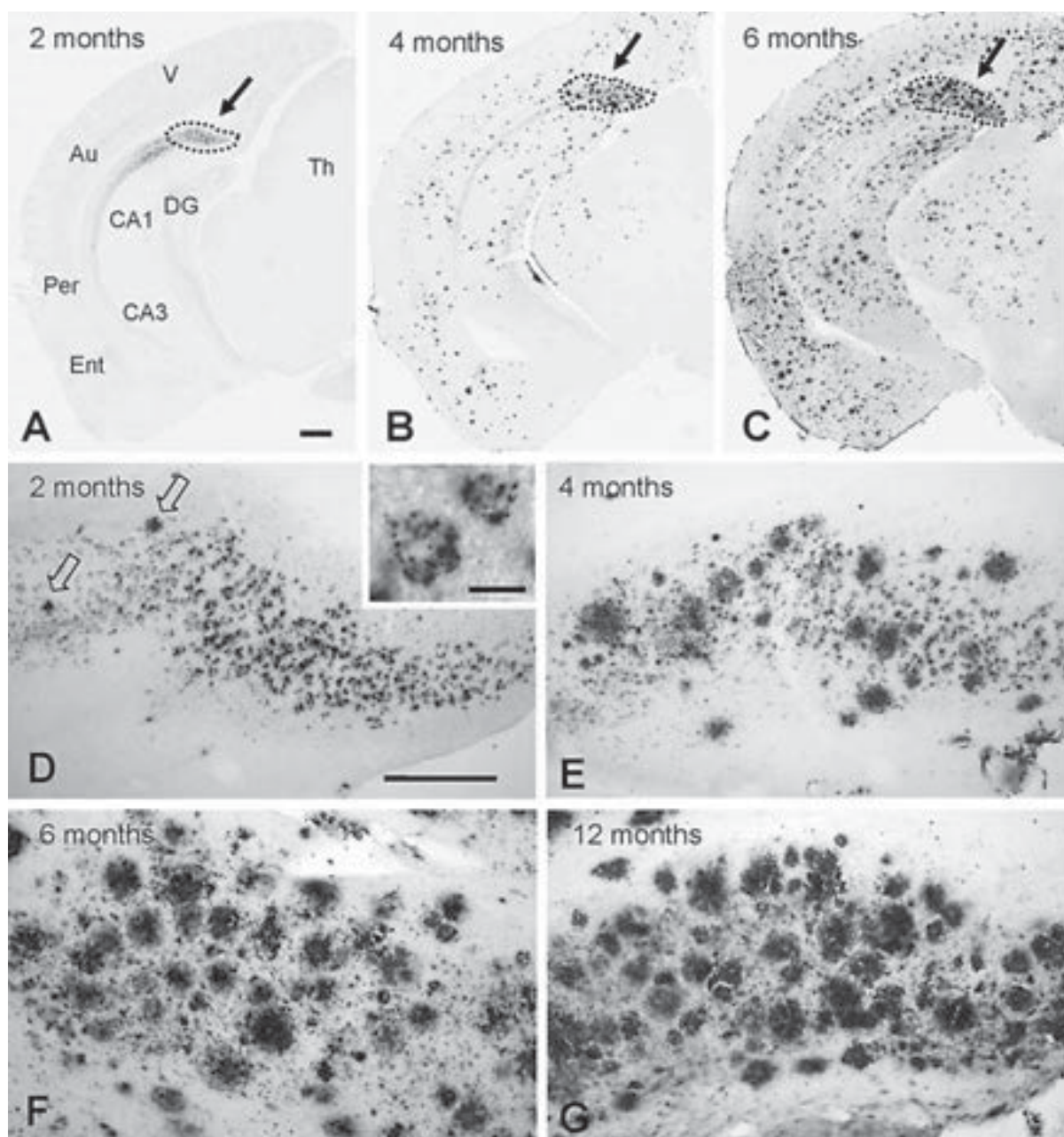


Fig. 4. Early accelerated intra- and extracellular A β accumulation in the A β PP/PS1 subiculum. A β ₄₂ immunohistochemistry at 2 (A and D), 4 (B and E), 6 (C and F), and 12 (G) months of age. A–C, panoramic views of the caudal telencephalon showing the A β ₄₂ immunoreactivity in the subiculum (dashed area pointed with a black arrow) compared to other hippocampal and cortical areas from 2 to 6 months. Intracellular A β appears as early as 2 months and neurons show a punctate labeling suggestive of a vesicular location (inset in D). Abundant A β plaques were already seen at 4 months of age and plaques progressively increased, in number and size, with age. CA1, CA3, hippocampal subfields; DG, dentate gyrus; Ent, entorhinal cortex; Per, perirhinal cortex; Au, auditory cortex. Scale bars, A–C, 500 μ m; D–G, 200 μ m; inset in D 10 μ m.

highly vulnerable brain areas, such as CA1 and entorhinal cortex, we have measured the area occupied by the A β deposits (plaque loading) in these brain regions using Thioflavin-S stained sections (images not shown). Thioflavin-S labeled only extracellular A β and allowed

better image analysis quantification of plaques since intracellular A β pool was excluded. As shown, the subiculum (Fig. 5A) is the earliest and most severely affected area by the extracellular amyloid pathology. The subicular amyloid load was $0.06 \pm 0.1\%$ and

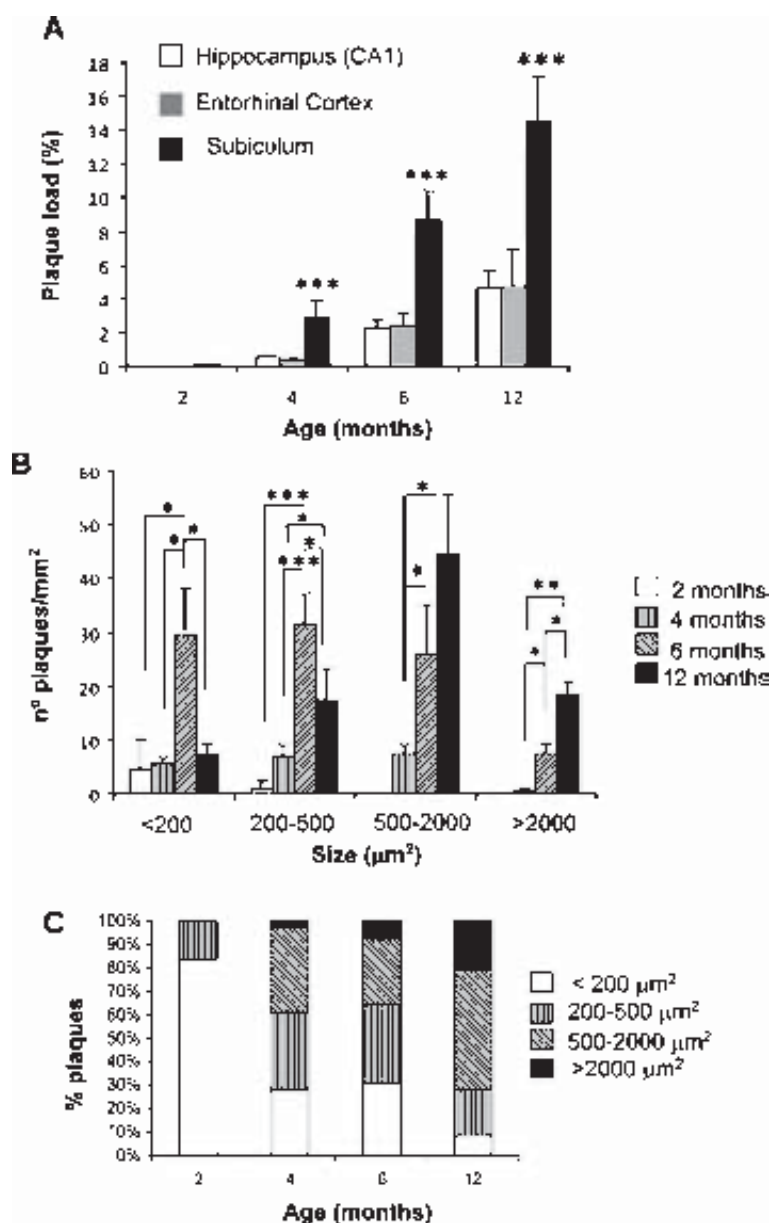


Fig. 5. A β load and plaque progression with age in A β PP/PS1 subiculum. A) A β load in subiculum rapidly increased with age and it was significantly higher than in CA1 and entorhinal cortex at all ages analyzed. B, C) The number (plaques/mm²) and the size (μm^2) of the A β plaques in the subiculum exhibited a marked increase with age (two tailed *t*-test, **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001).

2.77 \pm 1.17% at 2 and 4 months of age, respectively. A β deposition increased to 8.67 \pm 1.70% at 6 months of age and reached to 14.57 \pm 0.63% at 12 months (the maximum was at 18 months with 25.31 \pm 4.10%, not shown). A β load was significantly greater in subiculum than in CA1 and entorhinal cortex at all ages analyzed. At 4 months of age, the subicular amyloid deposition was markedly accelerated and reached up to 5 times higher than in CA1 and 7 times than in entorhinal cor-

tex. Then after, at 6 and 12 months, the plaque load in subiculum, was between 3–4 times higher than in CA1 or entorhinal cortex. Therefore, the subiculum showed the greatest age-related A β load and also exhibited the earliest neuronal loss.

The age-dependent increase in the total amyloid load in the subiculum appeared to be associated with both the number and size of the plaques. To support this observation, we next determined the plaque density

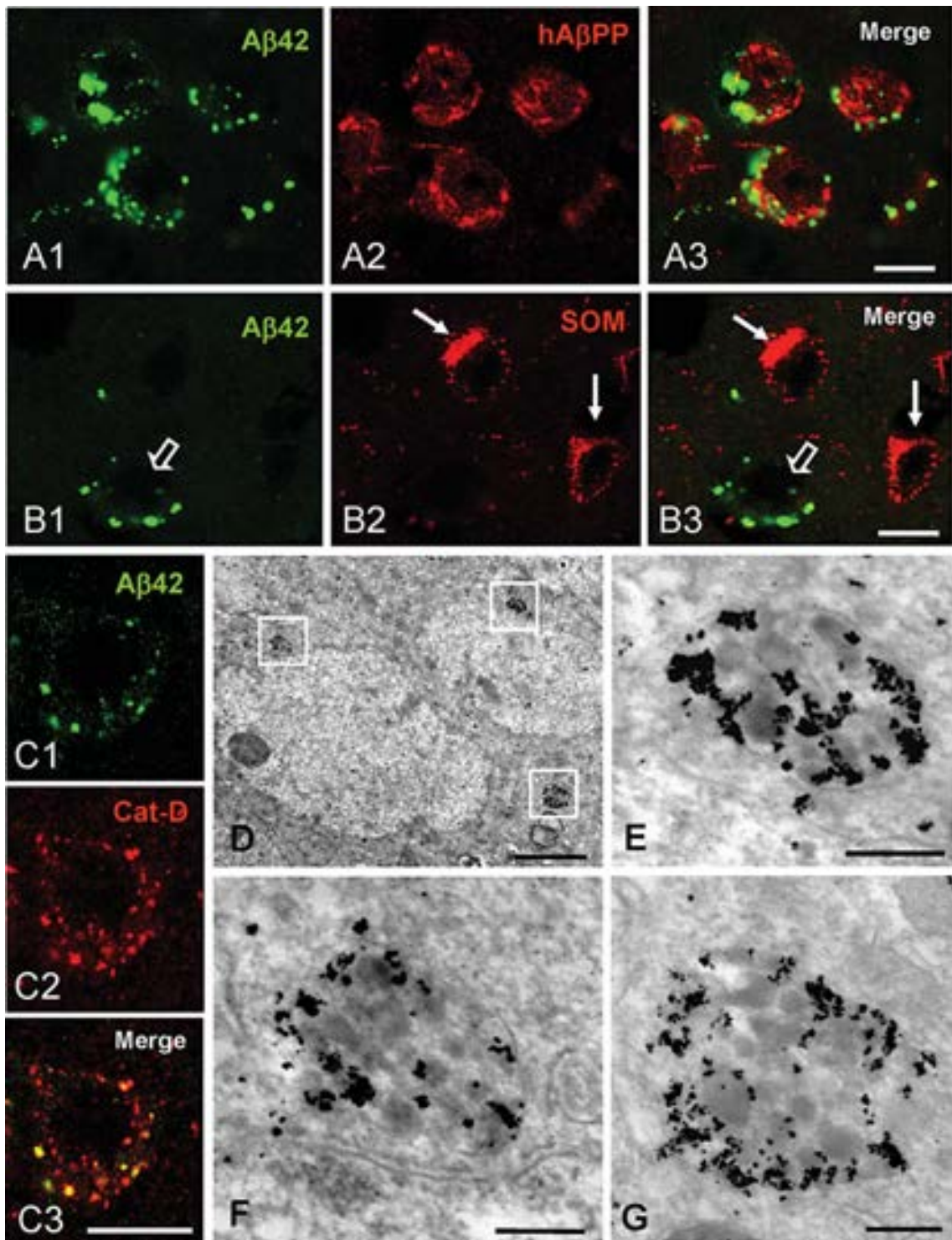


Fig. 6. Intracellular A β is mostly localized in lysosomal vesicles of principal cells. Double confocal immunofluorescence labelings show the presence of A β in A β PP-positive (principal) neurons (A1–A3) but not in SOM-interneurons (B1–B3). Most A β ₄₂ was localized in lysosomal vesicles as shown by double A β ₄₂/Cathepsin-D labeling and confocal microscopy (C1–C3). A β immunogold electron microscopy reveals the restricted subcellular location of A β within endolysosomal organells of principal neuronal cell bodies. Scale bars: A–C, 10 μ m; D, 2 μ m; E–G, 0.2 μ m.

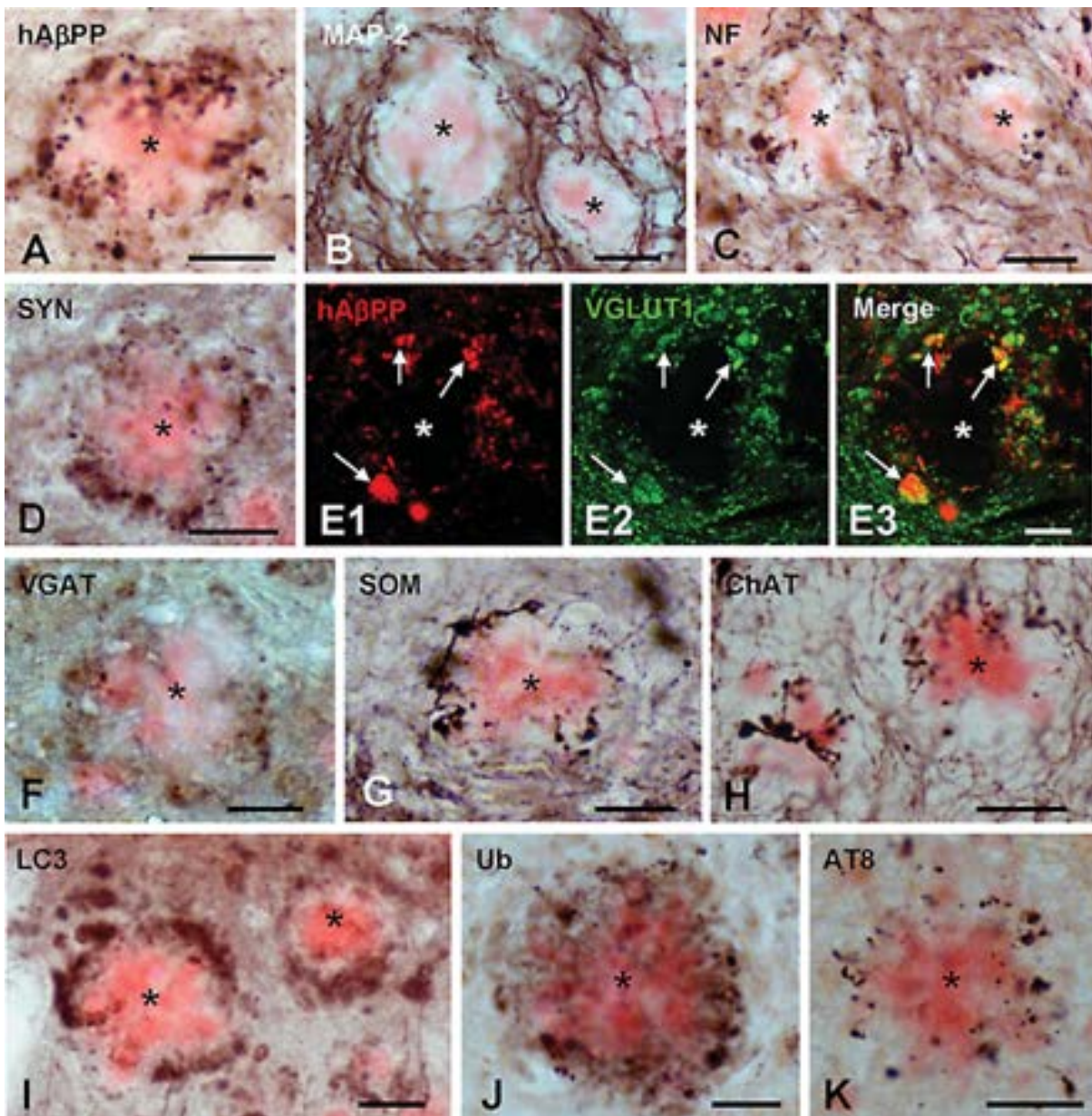


Fig. 7. A β plaques are closely surrounded by axonal/synaptic dystrophies containing phospho-tau and autophagy vesicles. A) A β plaque (Congo red-stained) surrounded by numerous dystrophic neurites immunopositive for hA β PP antibody. B) Dystrophic neurites were not immunopositive for MAP-2 (dendritic marker). C) Immunoreactivity for neurofilament (axonal marker) was found in dystrophic neurites surrounding plaques. D) Plaque associated dystrophies were immunoreactive for synaptophysin (synaptic marker). E1–E3) Confocal double immunofluorescence labeling for hA β PP (red) and VGLUT1 (green) shows extensive co-localization (arrows) of the two markers indicating the axonal/synaptic glutamatergic nature of hA β PP-positive dystrophic neurites around plaques. F–H) Congo red-stained plaques were surrounded by axonal/synaptic dystrophies immunopositive for VGAT (marker for GABAergic terminals), somatostatin (marker for a GABAergic subpopulation) and ChAT (cholinergic marker). I–K) Dystrophies around plaques were immunolabeled for the autophagy marker LC3, ubiquitin and phospho-tau (AT8). Asterisks indicate A β plaques. Scale bars: A–D and F–K, 25 μ m; E1–E3, 10 μ m.

(plaque/mm²) dissected into four size categories ranging from <200 μ m² to those >2000 μ m² (Fig. 5B), as well as the percent of each plaque category (Fig. 5C), at 2, 4, 6 and 12 months of age. The appearance of

plaques in this region began at 2 months of age and they were mostly under 200 μ m², and then progressively increased in number at 4 months with the formation also of bigger plaques. However, the most significant

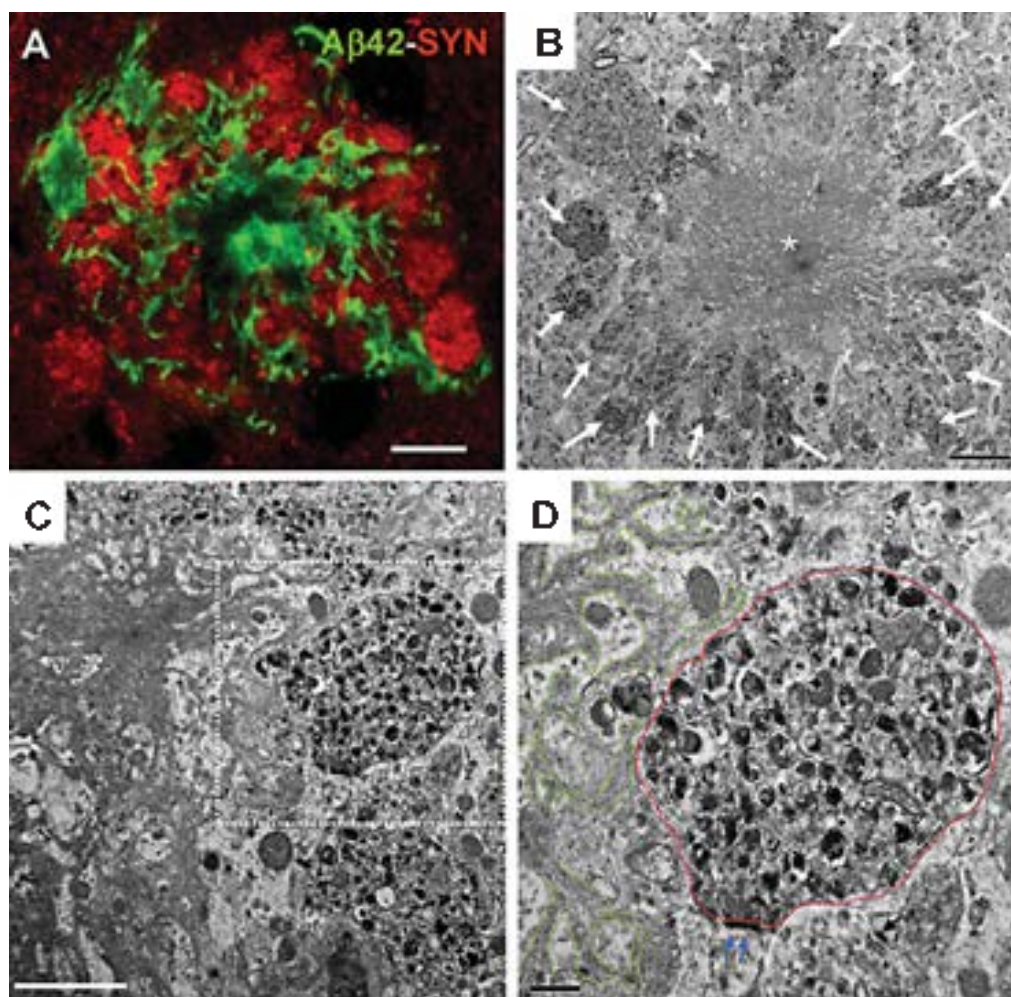


Fig. 8. Tight association between extracellular A β and synaptic dystrophies. A) Double confocal A β_{42} (green) and synaptophysin (SYN, red) labelling show how A β threads from a plaque closely cover SYN-positive dystrophies. B) Electron microscopy micrograph of an A β plaque (asterisk) surrounded by numerous dystrophic neurites (white arrows). C) An electron microscopy image of the plaque periphery showing dystrophic neurites in close contact with A β threads. D) is a higher magnification image of the squared area in C; a dystrophic presynaptic terminal (outlined with red line), contacting with a normal postsynaptic element (postsynaptic density is pointed with blue arrows), is in the very close proximity of A β threads (outlined in green color). Scale bar: A, 10 μ m; B, 5 μ m; C, 2 μ m; D, 0.5 μ m.

increase in the number of plaques/mm² was at the age of 6 months for each size category (5, 4.6, 3.4, and 14.5 times higher than at 4 months for those plaques <200, 200–500, 500–2000, and >2000 μ m², respectively, $n = 5$, two tailed t -test, $p < 0.05$), with the most abundant being those at <500 μ m². Interestingly, at 12 months the plaque distribution switched and the predominant plaque size was >500 μ m². Then our data demonstrated that the number of plaques significantly build-up with age, but most remarkable, plaque size also displayed a striking increment.

Since intraneuronal A β accumulation precedes amyloid plaque formation in the subiculum, we further

investigated the A β expression in subicular neurons as a potential toxic agent to induce the neurodegeneration. The early presence of intraneuronal A β in A β PP-positive cells was confirmed by double A β_{42} /hA β PP immunofluorescence labeling (Fig. 6A1–A3) in 2-month-old A β PP/PS1 mice. These A β PP-positive cells corresponded to principal neurons since the mutated human A β PP transgene is expressed only by this population in the transgenic mice used. It can be argued then that this early accumulation of A β within principal cells could be responsible of their vulnerability. However, SOM-positive interneurons were also highly affected at early ages, and these

cells did not accumulate intracellular A β (Fig. 6B1–B3), since they do not express the mutated human A β PP. Therefore, it is very unlikely that the neuronal loss in the subiculum, at least for interneurons, was induced by the intracellular A β .

As shown here, the labeling of A β ₄₂ and hA β PP just marginally overlaps in the same subcellular compartments. In fact, only $3.36 \pm 1.79\%$ ($n = 30$ cells) of A β ₄₂ co-localized with hA β PP. This demonstrated the specificity of the A β antibody, since it does not cross-react with the A β PP antibody and that hA β PP processing and A β accumulation should take place in different intracellular compartments. In this sense, the punctuate labeling of the A β ₄₂ antibody was suggestive of vesicular location. Several studies have reported the preferential location of A β in vesicles of the endosome-lysosome system [38] including autophagy vesicles [41, 45]. Confocal images of double A β ₄₂/cathepsin-D labeling (Fig. 6C1–C3) indicated that most of the A β was in fact associated with lysosomal structures in the somata of the principal subicular neurons. Quantitative analysis demonstrated that $88.9 \pm 18.2\%$ ($n = 50$ cells) of the intracellular A β ₄₂ labeling co-localized with cathepsin-D. Thus, A β is accumulated preferentially in lysosomal vesicles. Furthermore, immunogold electron microscopy experiments demonstrated a restricted location of A β within endolysosomal subcellular compartments of the principal neuronal somata (Fig. 6D–G). Immunogold labeled organelles displayed an electron-dense granular content typical of endolysosomes (see higher magnification images in Fig. 6E–G).

A β plaques as inductors of early axonal/presynaptic pathology in the subiculum

The pathogenic mechanisms leading to neuron loss in AD have not been completely elucidated yet, and the extracellular amyloid deposits could be major contributors for neuronal damage/loss. In our model, the hippocampal plaques are surrounded by numerous dystrophic neurites of axonal/presynaptic origin [41, 45]. Then, we next examined the dystrophy pathology in the subiculum and its association with amyloid plaques using light and electron microscopy approaches. The formation of plaques in the subiculum was paralleled with the appearance of dystrophic neurites in their very close periphery. The hA β PP antibody is a well-established marker for dystrophies (Fig. 7A), and in our model labeled dystrophies belonging to glutamatergic cells as we show here with the double labeling A β PP/VGLUT1 (see Fig. 7E1–E3). While

no dystrophic dendrites around plaques were detected with MAP2 immunostaining (Fig. 7B), numerous dystrophic neurites were labeled with different axonal/synaptic markers such as NF (Fig. 7C), synaptophysin (Fig. 7D), VLGUT1 (Fig. 7E2), and VGAT (Fig. 7F). In addition, we observed SOM-positive (7G) or ChAT-positive (7H) axonal dystrophies surrounding subicular plaques. Altogether, these data confirmed the axonal origin of the dystrophies that surround plaques in the subiculum.

We and others have reported the accumulation of autophagy vesicles within dystrophies [41, 45–47]. This abnormal collection of vesicles belonging to the autophagy-lysosome degradation system might result from a defective cytoskeleton-mediated transport. We have next checked whether subicular dystrophies displayed immunoreactivity for LC3 (autophagy marker), ubiquitin (marker for protein degradation), and AT8 (phosphorylated tau). As shown in Fig. 7 (I–K), these axonal dystrophies were strongly labeled with all these markers suggesting a focalized altered microtubule vesicular transport that compromise protein degradation with the subsequent accumulation of vesicles and un-degraded proteins that disrupts axonal structure.

A direct toxic effect of the A β plaques on surrounding axons might be the cause of dystrophic formation. In fact, the confocal microscopy evaluation of double A β ₄₂/synaptophysin labeling (Fig. 8A) revealed a very close spatial association between both markers with the extracellular A β encircling, almost wrapping, the synaptophysin-positive dystrophies. For a better resolution, we next evaluated this tight association between plaque and dystrophies at the transmission electron microscopy (Fig. 8B–D). Figure 8B shows a typical amyloid plaque in this model (neuritic plaque), completely surrounded by numerous dystrophic neurites. In their periphery, plaques gave off many long branches coming in close contact with the dystrophies (Fig. 8C, D). Dystrophies were morphologically characterized by the presence of multiple heterogeneous autophagy-like vesicles, as expected.

The early axonal defects in the subiculum of this AD model could directly affect presynaptic terminals. Though the plaque-associated dystrophies were labeled with the synaptic marker synaptophysin, this labeling could be due to the abnormal accumulation of this protein along the axon due to transport failure, and not to be present in synaptic boutons. However, electron microscopic examination revealed that presynaptic terminals were indeed dystrophic (Fig. 8D) and displayed abnormal morphology with huge collection of autophagy/lysosomal vesicles. Though these

dystrophic terminals made contact with normal post-synaptic elements their function and viability could be somehow compromised.

These data demonstrated the existence of an early axonal/synaptic pathology in the subiculum of this AD model that may represent the beginning of synaptic disruption and loss.

DISCUSSION

Neuron loss is the best anatomopathological substrate that correlates with cortical atrophy and dementia during disease progression in AD. However, most transgenic animals do not display this fundamental degenerative feature of patients. To evaluate the effectiveness of potential neuroprotective therapies for AD, it is essential that animal models exhibit neuronal damage/dysfunction, and even most importantly neuronal death, relevant to the disease in vulnerable brain regions and cell populations. The present work provides new evidence and further support our previous studies [24–27, 30, 41, 45] on the selective AD-like neurodegenerative phenotype of the A β PP751SweLondon/PS1M146L model (data summarized in Table 1). We show here that the subiculum of this model is the earliest affected hippocampal region exhibiting a wide repertoire of AD-like pathological manifestations including 1) accelerated A β accumulation, both intra- and extracellularly; 2) prominent axonal neuritic pathology, that affects presynaptic terminals, with the accumulation of autophagy vesicles, and 3), and most valuable, significant neuronal loss from principal and local inhibitory populations.

As we have reported previously, this A β PP/PS1 transgenic model has the advantage over other models of showing significant loss of neurons in highly vulnerable brain areas [24–26] similar to AD patients. Loss of interneurons was an early event (4–6 months of age) in the hippocampal CA subfields and dentate gyrus, as well as in the entorhinal cortex, however principal neurons were differentially affected by age in these areas. While the entorhinal principal neurons showed early vulnerability (6 months of age) the hippocampus (CA1 subfield) displayed significant pyramidal cell decline only at old ages (>17 months of age). Few others transgenic models have also been reported to have neuronal death [39, 48–51], however this was usually quantitatively minor and/or occurred at very late ages. Subicular neurodegeneration has been previously reported in the 5xFAD model at 9 months of age [38, 39]. Nevertheless, in these studies no quantita-

tive analysis was made to determine the extent of subicular cell loss and neither the vulnerable neuronal type was identified. Here we demonstrate by unbiased stereology a significant decline in SOM-containing interneurons (–27% and –69% at 4 and 6 months of age, respectively) and, most importantly, in principal subicular neurons (–28% at 6 months) of our A β PP/PS1 model at early ages. Therefore, this is the first study showing a quantitative decline of subicular neurons, and noteworthy, occurring as early as 4–6 months of age. Together, and of relevance, subiculum is the first hippocampal brain region exhibiting principal neuronal loss in this model.

Among the potential causative agents for this neuronal loss, A β is the leading candidate in amyloidogenic models bearing familial mutations, as the A β PP/PS1 model used in this study. In fact, A β pathology in the subiculum preceded the loss of neurons. Furthermore, we have also compared the severity of the amyloid pathology in the subiculum with other highly AD vulnerable brain areas, such as CA1 of hippocampus and entorhinal cortex. Interestingly, the subiculum displayed up to 5 and 7 fold increased A β load than CA1 and entorhinal cortex, respectively, at the age of 4 months. Therefore, subiculum is the earliest and most severely affected region by the amyloid pathology. In consequence, we also observed an extensive neuronal (pyramidal and GABAergic) degeneration in this particular brain region.

Abundant intraneuronal accumulation of A β ₄₂ was seen at 2 months of age mostly located in the endolysosomes and immediately after a rapid onset of amyloid plaques was manifested. As the plaque load increased with age the intracellular A β labeling was less evident. In fact, at 6 months of age it was really difficult to visualize A β -immunolabeled neuronal somata at light microscopy suggesting a possible transient localization of A β in the neuronal compartments (soma versus axonal/synaptic?). However, immunogold labeling demonstrated the presence of some intracellular A β within the cell bodies at least in 6-month-old A β PP/PS1 mice. We cannot rule out the possibility that plaques bind most A β antibodies thus preventing the intracellular A β labeling. Our results are in agreement with others since A β pathology (intra preceding extra) was reported to be early present in the subiculum of other transgenic models [38, 39, 52].

As to which A β (intra or extra) mainly contributes to the neuronal death in this region, our data point to the extracellular pool as the most likely toxic agent. Interneurons do not express the human mutant A β PP transgene in our A β PP/PS1 model (see Fig. 6),

Table 1
Summary of the major neuropathological findings in the A β PP751SweLondon/PS1M146L transgenic model

	Subiculum	Hippocampus (CA1) *	Entorhinal Cortex**
Intracellular A β	2 mo	2 mo	NT
Extracellular A β	2-3 mo	4 mo	4 mo
Dystrophic neurites	2-3 mo	4 mo	4 mo
Neuronal loss	4 mo (SOM+) 6 mo (pyramidal)	4 mo (CR+) 6 mo (SOM+) 18 mo (pyramidal)	6 mo (SOM+and pyramidal)
Neuroinflammation	3-4 mo	4-6 mo (microglial M2 phenotype) 18 mo (microglial M1 phenotype)	6 mo (microglial M2 and M1 phenotypes)

The age (months, mo) when intracellular A β (immunoreactivity with the A β ₄₂ or oligomer-specific OC antibodies), extracellular deposits (immunopositive for 6E10, A β ₄₂, or OC antibodies, or stained with thioflavin-s or congo red), dystrophic neurites around plaques (immunopositive for A β PP, SYN, ubiquitin, LC3, or phospho-tau AT8 antibodies), neuronal loss (measured by stereological analysis of SOM+, CR+ or pyramidal neurons), and neuroinflammation (microglial and astroglial activation) are detected is indicated. NT, non detected. SOM+, immunopositive somatostatin interneurons; CR+, immunopositive calretinin interneurons. *Data from references [24, 25, 27]. **Data from reference [26].

therefore these cells do not produce and accumulate A β , ruling out the possibility of the intraneuronal source as the causative agent for the death in the SOM-population. On the other hand, principal subicular neurons contain intracellular A β at an early age (2 months or even before), and though the present results do not allow us to completely discard the toxic role of this intracellular stock, the loss of this population (approximately 30%) is delayed until the age of 6 months. Thus, it is most likely to be associated with the accelerated extracellular A β accumulation. This asseveration was also based on: 1) early (2 months) intracellular A β accumulation is seen in CA1 principal neurons of our model (see Fig. 4 A,D), however no neuronal loss in the CA1 pyramidal layer is detected until 17-18 months of age [27, 44]; 2) principal cell loss in the entorhinal cortex is also an early event (6 months) in this model, however it is associated with extracellular rather than intracellular A β pathology [26]. In fact, the vulnerable principal neurons in the entorhinal cortex were those located in the highly A β loaded deep layers (V-VI) and interestingly, these cells did not even expressed the human A β PP transgene and therefore did not accumulate A β intracellularly; 3) early intracellular A β has been detected in many other animal models, however neuronal loss is usually absent or occurred at late ages [7-10]; 4) A β plaques are a potent source of neurotoxic damage as many axonal dystrophies developed in their close periphery (neuritic plaques); 5) A β plaques induce a strong glial activation in subiculum (data not shown) as seen in hippocampus and entorhinal cortex [26, 27]. A cytotoxic profile of this inflammatory response was temporally associated with the pyramidal neuronal death in these brain regions.

Therefore, cerebral amyloidosis (extracellular) seems to be the driving force for neuronal loss and the axonal/synaptic damage in the subiculum as well

as in other brain areas [24-26, 30, 41, 45]. Amyloid plaques are potentially major sources of soluble and toxic oligomeric A β [53]. Then, the accelerated and severe formation of plaques in subiculum, compared to other brain regions, could locally increase the concentration of these oligomers since early ages affecting the most vulnerable neuronal populations.

Subicular A β deposits were surrounded by hyperphosphorylated tau-positive axonal dystrophies and A β oligomers have been shown to induce an increase in tau hyperphosphorylation [54, 55] as well as axonal transport failure with organelle accumulation through GSK3 β signaling [45, 56]. In support of this idea, we have recently demonstrated the involvement of A β oligomers in the activation of GSK3 β and tau phosphorylation [30]. Together, A β oligomers released from plaques might cause locally the interruption of axonal transport leading to a severe accumulation of vesicles mostly from autophagy pathway (LC3-positive) due to failed lysosome maturation [41, 45] (present work) and in consequence the formation of axonal dystrophies. These dystrophies are positive for synaptic proteins (synaptophysin or VGluT1) as shown by confocal microscopy which might reflect synaptic protein accumulation due to axonal transport deficiency. Alternatively, some (or most) dystrophies might be actually presynaptic boutons directly affected by the plaque-associated toxic A β oligomers. In agreement with the last suggestion, we have demonstrated by electron microscopy the presence of dystrophic synaptic terminals making contact with normal postsynaptic elements near plaques in subiculum as we have previously shown also in CA1 [41]. These morphologically altered synaptic terminals might represent the initial step of axonal degeneration previous to the synapse loss, the major correlate for cognitive deficits in the initial stages of the disease [1, 3, 5, 6]. In addition,

axonal/synaptic damage could trigger a neurodegenerative process toward the cell bodies. In line with this, we and others have reported a relationship between extracellular A β accumulation in axonal fields and the progressive degeneration of their away located projecting neurons in AD models [24, 57]. This suggestion is also supported by the apparent resistance of the PV positive GABAergic cells. As shown in this and previous work, the number of subicular, hippocampal, and entorhinal PV positive cells was not modified in the A β PP/PS1 model. These data are in line with the relative resistance of these cells observed in AD patients [58, 59]. Furthermore, at the age tested, the PV positive cells developed few (if any) dystrophic neurites even in close proximity to the A β plaques (see Fig. 2B2). At present, we do not know the mechanisms that determine the relative protection of this neuronal subpopulation to the A β pathology. However, it is possible that the high expression of a Ca²⁺-chelating protein, such as PV, could protect the cell from the extracellular A β damage.

Altogether, our data support A β plaques as major contributors of neuronal/axonal damage in this AD model. The relevance of this conclusion for the disease in humans could be of controversial since no clear association has been made so far between the extent of amyloid burden and dementia severity in AD patients. Moreover, A β deposition begins over a decade prior to the dementia and asymptomatic cortical A β deposition in elderly individuals is also well documented [60–64]. However, a recent report [65] has shed light on this intriguing topic and discriminate demented and non-demented individuals with high amyloid burden on the basis of their neuropathological phenotype. Authors identified that plaques in demented cases had significant higher amount of oligomeric A β and, importantly, a higher number of dystrophic neurites compared to non-demented individuals. In addition, accumulation of phospho-tau into synaptic compartments, and stronger glial activation response discriminated demented from non-demented cases. These findings highlight the existence of different plaques, in relation to their toxicity, that might account for the onset and severity of dementia during disease progression. Therefore, the characterization of plaques on the basis of their capacity to induce axonal and neuronal damage is crucial to validate animal models for research and drug testing. In this sense, our A β PP/PS1 model is of great interest since these mice develop human-like neuritic plaques whose toxicity can be modulated *in vivo*, as we have recently shown, by lithium administration resulting in a marked reduc-

tion of neuronal and axonal damage and cognitive improvement [66].

The subiculum is the main hippocampal output, and therefore hippocampal–cortical and hippocampal–subcortical communication arises most predominantly from subicular neurons [12, 13]. In fact, this region is specifically involved in spatial memory and navigation, as well as in stress responses and limbic-mediated affective, cognitive, and behavioral processes [67, 68]. Subiculum may act as a possible interface between the hippocampus and the neocortex during the consolidation of memories [69]. Interestingly, a relationship between cortical thinning in the subicular and entorhinal regions with the decline in the ability to encode new memories over time has been reported in mild cognitive impairment patients [70]. Then, the early reduction in the subicular neurons along with the axonal/synaptic damage might contribute to the altered neuronal network in the hippocampus and entorhinal cortex seen in AD.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), from Instituto de Salud Carlos III of Spain, through grants PI12/01431 (to AG) and PI12/01439 (to JV), and by CIBERNED (PI2010/08 and PI2013/01) to JV and AG. LT-E and ES-M were recipients of PhD fellowships (FPU) from Ministerio de Educación, Cultura y Deportes (Spain). We thank Sanofi for the A β PP/PS1 model used in this study, and Mercedes Aneiros for her expert technical assistance. Antonia Gutierrez and Javier Vitorica are Co-Senior corresponding authors.

Authors' disclosures available online (<http://www.jalz.com/disclosures/view.php?id=2268>).

REFERENCES

- [1] Davies CA, Mann DM, Sumpter PQ, Yates PO (1987) A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* **78**, 151-164.
- [2] Gomez-Isla T, Price JL, McKeel DW, Jr, Morris JC, Growdon JH, Hyman BT (1996) Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci* **16**, 4491-4500.
- [3] Masliah E, Mallory M, Alford M, DeTeresa R, Hansen LA, McKeel DW Jr, Morris JC (2001) Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology* **56**, 127-129.
- [4] Price JL, Ko AI, Wade MJ, Tsou SK, McKeel DW, Morris JC (2001) Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer disease. *Arch Neurol* **58**, 1395-1402.

- [5] Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, Mufson EJ (2006) Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* **27**, 1372-1384.
- [6] Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* **30**, 572-580.
- [7] Kitazawa M, Medeiros R, Laferla FM (2012) Transgenic mouse models of Alzheimer disease: Developing a better model as a tool for therapeutic interventions. *Curr Pharm Des* **18**, 1131-1147.
- [8] Laferla FM, Green KN (2012) Animal models of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, pii: a006320.
- [9] Platt TL, Reeves VL, Murphy MP (2013) Transgenic models of Alzheimer's disease: Better utilization of existing models through viral transgenesis. *Biochim Biophys Acta* **1832**, 1437-1448.
- [10] Schaeffer EL, Figueiro M, Gattaz WF (2011) Insights into Alzheimer disease pathogenesis from studies in transgenic animal models. *Clinics (Sao Paulo)* **66**(Suppl 1), 45-54.
- [11] Amaral DG, Witter MP (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience* **31**, 571-591.
- [12] O'Mara S (2005) The subiculum: What it does, what it might do, and what neuroanatomy has yet to tell us. *J Anat* **207**, 271-282.
- [13] O'Mara SM, Commins S, Anderson M, Gigg J (2001) The subiculum: A review of form, physiology and function. *Prog Neurobiol* **64**, 129-155.
- [14] Ball MJ (1977) Neuronal loss, neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in the hippocampus with ageing and dementia. A quantitative study. *Acta Neuropathol* **37**, 111-118.
- [15] Bobinski M, Wegiel J, Tarnawski M, Bobinski M, Reisberg B, de Leon MJ, Miller DC, Wisniewski HM (1997) Relationships between regional neuronal loss and neurofibrillary changes in the hippocampal formation and duration and severity of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **56**, 414-420.
- [16] Davies DC, Horwood N, Isaacs SL, Mann DM (1992) The effect of age and Alzheimer's disease on pyramidal neuron density in the individual fields of the hippocampal formation. *Acta Neuropathol* **83**, 510-517.
- [17] Kril JJ, Patel S, Harding AJ, Halliday GM (2002) Neuron loss from the hippocampus of Alzheimer's disease exceeds extracellular neurofibrillary tangle formation. *Acta Neuropathol* **103**, 370-376.
- [18] Simic G, Kostovic I, Winblad B, Bogdanovic N (1997) Volume and number of neurons of the human hippocampal formation in normal aging and Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* **379**, 482-494.
- [19] West MJ (1993) Regionally specific loss of neurons in the aging human hippocampus. *Neurobiol Aging* **14**, 287-293.
- [20] West MJ, Kawas CH, Martin LJ, Troncoso JC (2000) The CA1 region of the human hippocampus is a hot spot in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* **908**, 255-259.
- [21] West MJ, Kawas CH, Stewart WF, Rudow GL, Troncoso JC (2004) Hippocampal neurons in pre-clinical Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **25**, 1205-1212.
- [22] Bobinski M, Wegiel J, Wisniewski HM, Tarnawski M, Bobinski M, Reisberg B, de Leon MJ, Miller DC (1996) Neurofibrillary pathology—correlation with hippocampal formation atrophy in Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* **17**, 909-919.
- [23] Franko E, Joly O (2013) Evaluating Alzheimer's disease progression using rate of regional hippocampal atrophy. *PLoS One* **8**, e71354.
- [24] Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuete M, Vitorica J, Gutierrez A (2010) Calretinin interneurons are early targets of extracellular amyloid-beta pathology in PS1/AbetaPP Alzheimer mice hippocampus. *J Alzheimers Dis* **21**, 119-132.
- [25] Ramos B, Baglietto-Vargas D, Del Rio JC, Moreno-Gonzalez I, Santa-Maria C, Jimenez S, Caballero C, Lopez-Tellez JF, Khan ZU, Ruano D, Gutierrez A, Vitorica J (2006) Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1xAPP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **27**, 1658-1672.
- [26] Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Del Rio JC, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuete M, Vitorica J, Gutierrez A (2009) Extracellular amyloid-beta and cytotoxic glial activation induce significant entorhinal neuron loss in young PS1(M146L)/APP(751SL) mice. *J Alzheimers Dis* **18**, 755-776.
- [27] Jimenez S, Baglietto-Vargas D, Caballero C, Moreno-Gonzalez I, Torres M, Sanchez-Varo R, Ruano D, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J (2008) Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: Age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *J Neurosci* **28**, 11650-11661.
- [28] Killiany RJ, Hyman BT, Gomez-Isla T, Moss MB, Kikinis R, Jolesz F, Tanzi R, Jones K, Albert MS (2002) MRI measures of entorhinal cortex vs hippocampus in preclinical AD. *Neurology* **58**, 1188-1196.
- [29] Pennanen C, Kivipelto M, Tuomainen S, Hartikainen P, Hanninen T, Laakso MP, Hallikainen M, Vanhanen M, Nissinen A, Helkala EL, Vainio P, Vanninen R, Partanen K, Soininen H (2004) Hippocampus and entorhinal cortex in mild cognitive impairment and early AD. *Neurobiol Aging* **25**, 303-310.
- [30] Jimenez S, Torres M, Vizuete M, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Trujillo-Estrada L, Carmona-Cuenca I, Caballero C, Ruano D, Gutierrez A, Vitorica J (2011) Age-dependent accumulation of soluble amyloid beta (A β) oligomers reverses the neuroprotective effect of soluble amyloid precursor protein-alpha (sAPP(alpha)) by modulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-GSK-3beta pathway in Alzheimer mouse model. *J Biol Chem* **286**, 18414-18425.
- [31] Ding SL (2013) Comparative anatomy of the prosubiculum, subiculum, presubiculum, postsubiculum, and parasubiculum in human, monkey, and rodent. *J Comp Neurol* **521**, 4145-4162.
- [32] Apostolova LG, Dutton RA, Dinov ID, Hayashi KM, Toga AW, Cummings JL, Thompson PM (2006) Conversion of mild cognitive impairment to Alzheimer disease predicted by hippocampal atrophy maps. *Arch Neurol* **63**, 693-699.
- [33] Falke E, Nissanov J, Mitchell TW, Bennett DA, Trojanowski JQ, Arnold SE (2003) Subicular dendritic arborization in Alzheimer's disease correlates with neurofibrillary tangle density. *Am J Pathol* **163**, 1615-1621.
- [34] Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR, Barnes CL (1984) Alzheimer's disease: Cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science* **225**, 1168-1170.
- [35] La JR, Perrotin A, de LS, V, Egret S, Doeuvre L, Belliard S, Eustache F, Desgranges B, Chetelat G (2013) Hippocampal subfield volumetry in mild cognitive impairment, Alzheimer's

- disease and semantic dementia. *Neuroimage Clin* **3**, 155-162.
- [36] Van Hoesen GW, Hyman BT (1990) Hippocampal formation: Anatomy and the patterns of pathology in Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* **83**, 445-457.
- [37] Davies DC, Wilmott AC, Mann DM (1988) Senile plaques are concentrated in the subicular region of the hippocampal formation in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **94**, 228-233.
- [38] Eimer WA, Vassar R (2013) Neuron loss in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease correlates with intraneuronal Abeta42 accumulation and Caspase-3 activation. *Mol Neurodegener* **8**, 2.
- [39] Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van EL, Berry R, Vassar R (2006) Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: Potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci* **26**, 10129-10140.
- [40] Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, Planche M, Canton T, Jedidi I, Gohin M, Wirths O, Bayer TA, Langui D, Duyckaerts C, Tremp G, Pradier L (2003) Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with Abeta deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp Neurol* **184**, 247-263.
- [41] Sanchez-Varo R, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, De C, V, Jimenez S, Ruano D, Vizuete M, Davila JC, Garcia-Verdugo JM, Jimenez AJ, Vitorica J, Gutierrez A (2012) Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer's mice hippocampus. *Acta Neuropathol* **123**, 53-70.
- [42] Paxinos G, Franklin KBJ (2008) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, New York.
- [43] Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B (1988) The new stereological tools: Disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* **96**, 857-881.
- [44] Schmitz C, Rutten BP, Pielen A, Schafer S, Wirths O, Tremp G, Czech C, Blanchard V, Multhaup G, Rezaie P, Korr H, Steinbusch HW, Pradier L, Bayer TA (2004) Hippocampal neuron loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **164**, 1495-1502.
- [45] Torres M, Jimenez S, Sanchez-Varo R, Navarro V, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Carmona I, Davila JC, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J (2012) Defective lysosomal proteolysis and axonal transport are early pathogenic events that worsen with age leading to increased APP metabolism and synaptic Abeta in transgenic APP/PS1 hippocampus. *Mol Neurodegener* **7**, 59.
- [46] Lee S, Sato Y, Nixon RA (2011) Primary lysosomal dysfunction causes cargo-specific deficits of axonal transport leading to Alzheimer-like neuritic dystrophy. *Autophagy* **7**, 1562-1563.
- [47] Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, Cuervo AM (2005) Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: An immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol* **64**, 113-122.
- [48] Casas C, Sergeant N, Itier JM, Blanchard V, Wirths O, van der KN, Vingtdoux V, van de SE, Ret G, Canton T, Drobecq H, Clark A, Bonici B, Delacourte A, Benavides J, Schmitz C, Tremp G, Bayer TA, Benoit P, Pradier L (2004) Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *Am J Pathol* **165**, 1289-1300.
- [49] Cohen RM, Rezai-Zadeh K, Weitz TM, Rentsendorj A, Gate D, Spivak I, Bholat Y, Vasilevko V, Glabe CG, Breunig JJ, Rakic P, Davtyan H, Agadjanyan MG, Kepe V, Barrio JR, Bannykh S, Szekely CA, Pechnick RN, Town T (2013) A transgenic Alzheimer rat with plaques, tau pathology, behavioral impairment, oligomeric abeta, and frank neuronal loss. *J Neurosci* **33**, 6245-6256.
- [50] Saul A, Sprenger F, Bayer TA, Wirths O (2013) Accelerated tau pathology with synaptic and neuronal loss in a novel triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **34**, 2564-2573.
- [51] Wright AL, Zinn R, Hohensinn B, Konen LM, Beynon SB, Tan RP, Clark IA, Abdipranoto A, Vissel B (2013) Neuroinflammation and neuronal loss precede Abeta plaque deposition in the hAPP-J20 mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* **8**, e59586.
- [52] Ronnback A, Zhu S, Dillner K, Aoki M, Lilius L, Naslund J, Winblad B, Graff C (2011) Progressive neuropathology and cognitive decline in a single Arctic APP transgenic mouse model. *Neurobiol Aging* **32**, 280-292.
- [53] Martins IC, Kuperstein I, Wilkinson H, Maes E, Vanbrabant M, Jonckheere W, Van GP, Hartmann D, D'Hooge R, De SB, Schymkowitz J, Rousseau F (2008) Lipids revert inert Abeta amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice. *EMBO J* **27**, 224-233.
- [54] De Felice FG, Wu D, Lambert MP, Fernandez SJ, Velasco PT, Lacor PN, Bigio EH, Jerecic J, Acton PJ, Shughrue PJ, Chen-Dodson E, Kinney GG, Klein WL (2008) Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers. *Neurobiol Aging* **29**, 1334-1347.
- [55] Jin M, Shepardson N, Yang T, Chen G, Walsh D, Selkoe DJ (2011) Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 5819-5824.
- [56] Decker H, Lo KY, Unger SM, Ferreira ST, Silverman MA (2010) Amyloid-beta peptide oligomers disrupt axonal transport through an NMDA receptor-dependent mechanism that is mediated by glycogen synthase kinase 3beta in primary cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* **30**, 9166-9171.
- [57] Liu Y, Yoo MJ, Savonenko A, Stirling W, Price DL, Borchelt DR, Mamounas L, Lyons WE, Blue ME, Lee MK (2008) Amyloid pathology is associated with progressive monoaminergic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* **28**, 13805-13814.
- [58] Iwamoto N, Emson PC (1991) Demonstration of neurofibrillary tangles in parvalbumin-immunoreactive interneurons in the cerebral cortex of Alzheimer-type dementia brain. *Neurosci Lett* **128**, 81-84.
- [59] Takahashi H, Brasnjevic I, Rutten BP, van der KN, Perl DP, Bouras C, Steinbusch HW, Schmitz C, Hof PR, Dickstein DL (2010) Hippocampal interneuron loss in an APP/PS1 double mutant mouse and in Alzheimer's disease. *Brain Struct Funct* **214**, 145-160.
- [60] Bennett DA (2006) Postmortem indices linking risk factors to cognition: Results from the Religious Order Study and the Memory and Aging Project. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **20**, S63-S68.
- [61] Kantarci K (2014) Molecular imaging of Alzheimer disease pathology. *AJNR Am J Neuroradiol*. doi: 10.3174/ajnr.A3847
- [62] Negash S, Bennett DA, Wilson RS, Schneider JA, Arnold SE (2011) Cognition and neuropathology in aging: Multidimen-

- sional perspectives from the Rush Religious Orders Study and Rush Memory And Aging Project. *Curr Alzheimer Res* **8**, 336-340.
- [63] Perrin RJ, Fagan AM, Holtzman DM (2009) Multimodal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease. *Nature* **461**, 916-922.
- [64] Price JL, Morris JC (1999) Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **45**, 358-368.
- [65] Perez-Nievas BG, Stein TD, Tai HC, Dols-Icardo O, Scotton TC, Barroeta-Espar I, Fernandez-Carballo L, de Munain EL, Perez J, Marquie M, Serrano-Pozo A, Frosch MP, Lowe V, Parisi JE, Petersen RC, Ikonomic MD, Lopez OL, Klunk W, Hyman BT, Gomez-Isla T (2013) Dissecting phenotypic traits linked to human resilience to Alzheimer's pathology. *Brain* **136**, 2510-2526.
- [66] Trujillo-Estrada L, Jimenez S, De C, Torres V, Baglietto-Vargas M, Moreno-Gonzalez D, Navarro I, Sanchez-Varo V, Sanchez-Mejias R, Davila E, Vizuete JC, Gutierrez M, Vitorica A, J (2013) *In vivo* modification of Abeta plaque toxicity as a novel neuroprotective lithium-mediated therapy for Alzheimer's disease pathology. *Acta Neuropathol Commun* **1**, 73.
- [67] O'Mara S (2006) Controlling hippocampal output: The central role of subiculum in hippocampal information processing. *Behav Brain Res* **174**, 304-312.
- [68] O'Mara SM, Sanchez-Vives MV, Brotons-Mas JR, O'Hare E (2009) Roles for the subiculum in spatial information processing, memory, motivation and the temporal control of behaviour. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **33**, 782-790.
- [69] Craig S, Commins S (2006) The subiculum to entorhinal cortex projection is capable of sustaining both short- and long-term plastic changes. *Behav Brain Res* **174**, 281-288.
- [70] Burggren AC, Renner B, Jones M, Donix M, Suthana NA, Martin-Harris L, Ercoli LM, Miller KJ, Siddarth P, Small GW, Bookheimer SY (2011) Thickness in entorhinal and subicular cortex predicts episodic memory decline in mild cognitive impairment. *Int J Alzheimers Dis* **2011**, 956053.

Anexo 2

Trujillo-Estrada L, Jimenez S, De Castro V, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Navarro V, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Davila JC, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J. (2013). In vivo modification of Abeta plaque toxicity as a novel neuroprotective lithium-mediated therapy for Alzheimer's disease pathology. *Acta Neuropathol Commun.*, 12;1(1):73.

RESEARCH

Open Access

In vivo modification of Abeta plaque toxicity as a novel neuroprotective lithium-mediated therapy for Alzheimer's disease pathology

Laura Trujillo-Estrada^{1,3†}, Sebastian Jimenez^{2,3,4†}, Vanessa De Castro^{1,3}, Manuel Torres^{2,3,4,5}, David Baglietto-Vargas^{1,3,6}, Ines Moreno-Gonzalez^{1,3,7}, Victoria Navarro^{2,3,4}, Raquel Sanchez-Varo^{1,3}, Elisabeth Sanchez-Mejias^{1,3}, Jose Carlos Davila^{1,3}, Marisa Vizuete^{2,3,4}, Antonia Gutierrez^{1,3*} and Javier Vitorica^{2,3,4*}

Abstract

Background: Alzheimer's disease (AD) is characterized by the abnormal accumulation of extracellular beta-amyloid (Abeta) plaques, intracellular hyperphosphorylated tau, progressive synaptic alterations, axonal dystrophies, neuronal loss and the deterioration of cognitive capabilities of patients. However, no effective disease-modifying treatment has been yet developed. In this work we have evaluated whether chronic lithium treatment could ameliorate the neuropathology evolution of our well characterized PS1M146LxAPP^{Swe}-London mice model.

Results: Though beneficial effects of lithium have been previously described in different AD models, here we report a novel in vivo action of this compound that efficiently ameliorated AD-like pathology progression and rescued memory impairments by reducing the toxicity of Abeta plaques. Transgenic PS1M146LxAPP^{Swe}-London mice, treated before the pathology onset, developed smaller plaques characterized by higher Abeta compaction, reduced oligomeric-positive halo and therefore with attenuated capacity to induce neuronal damage. Importantly, neuronal loss in hippocampus and entorhinal cortex was fully prevented. Our data also demonstrated that the axonal dystrophic area associated with lithium-modified plaques was highly reduced. Moreover, a significant lower accumulation of phospho-tau, LC3-II and ubiquitinated proteins was detected in treated mice. Our study highlights that this switch of plaque quality by lithium could be mediated by astrocyte activation and the release of heat shock proteins, which concentrate in the core of the plaques.

Conclusions: Our data demonstrate that the pharmacological in vivo modulation of the extracellular Abeta plaque compaction/toxicity is indeed possible and, in addition, might constitute a novel promising and innovative approach to develop a disease-modifying therapeutic intervention against AD.

Keywords: Alzheimer, Lithium treatment, Transgenic mice, Neuronal degeneration, Axonal dystrophies, Abeta plaques, Toxicity

* Correspondence: agutierrez@uma.es; vitorica@us.es

†Equal contributors

¹Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071 Málaga, Spain

²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

Background

In Alzheimer's disease (AD), the abnormal accumulation of extracellular beta-amyloid (Abeta) plaques and intracellular hyperphosphorylated tau induces progressive synaptic alterations, axonal dystrophies, neuronal loss and the deterioration of cognitive capabilities of patients [1,2]. In spite to the relatively large information about the AD pathology, no effective disease-modifying treatment has been yet developed. Within the different compounds tested, lithium, a primary drug to treat bipolar disorder, has also been suggested as a potential treatment against AD [3-6]. In fact, clinical studies indicated that lithium could be preventive in patients with MCI, whereas no beneficial effects were observed in mild to moderate AD [4]. In addition, epidemiological studies also reported a reducing risk of AD in patients with bipolar disorders treated with Li [5]. Thus, lithium may indeed constitute a useful preventive treatment for individuals at high risk of AD and/or preclinical stages of the disease.

The neuroprotective mechanisms of lithium are not completely understood. In AD models, lithium could reduce the AD pathology inhibiting (directly and/or indirectly) the activity of the tau kinase GSK-3beta. Whereas this inhibition would preclude tau phosphorylation [7,8], dystrophy formation and neuronal degeneration [9,10], the therapeutic benefits of this treatment have been questioned [11]. On the other hand, lithium also mediated the inhibition of inositol monophosphatase and the induction of mTOR-independent autophagic process [12,13]. This induction may be important in the prevention or attenuation of neurodegeneration associated with aggregated proteins. Moreover, since the accumulation of autophagic vesicles could also be implicated in the formation of axonal dystrophies in AD models [14-17], lithium should alleviate the progression of these pathological features. However, while several studies have shown beneficial effects in lowering Abeta load [18-20], others reported no effect or even increased Abeta production [11,21,22].

The origin of these controversies is currently unknown. Among other factors, the different AD models, the different protocols of lithium administration or dosage and, perhaps more relevant, the partial neuropathology displayed for most of the AD models, could explain the discrepancies between the different effects of lithium treatment in transgenic models.

In this work we have evaluated the effect of chronic oral lithium treatment using the bigenic PS1M146LxAPPswe-London mice. This model displayed early degeneration of O-LM and HIPP interneurons (SOM/NPY-positive), in hippocampus and entorhinal cortex [23,24]. These GABAergic cells are implicated in memory/learning processes and degenerate in AD patients [25,26]. Our data demonstrated that chronic (from 3- to 9-month-old) oral

lithium administration, initiated before the onset of Abeta deposits, efficiently prevented most of the early neuropathological manifestations of our PS1xAPP model. Lithium prevented the neuronal loss (at both hippocampus and entorhinal cortex), reduced the tau phosphorylation and the formation of axonal dystrophies and, in consequence, ameliorated behavioral/memory deficits observed at this age. These effects were mediated by increasing the compaction of Abeta plaques and lowering their toxic oligomeric halo. This modification on Abeta deposits toxicity is a novel disease-modifying effect of lithium, acting through the astrocytes and the release of heat shock proteins (Hsps).

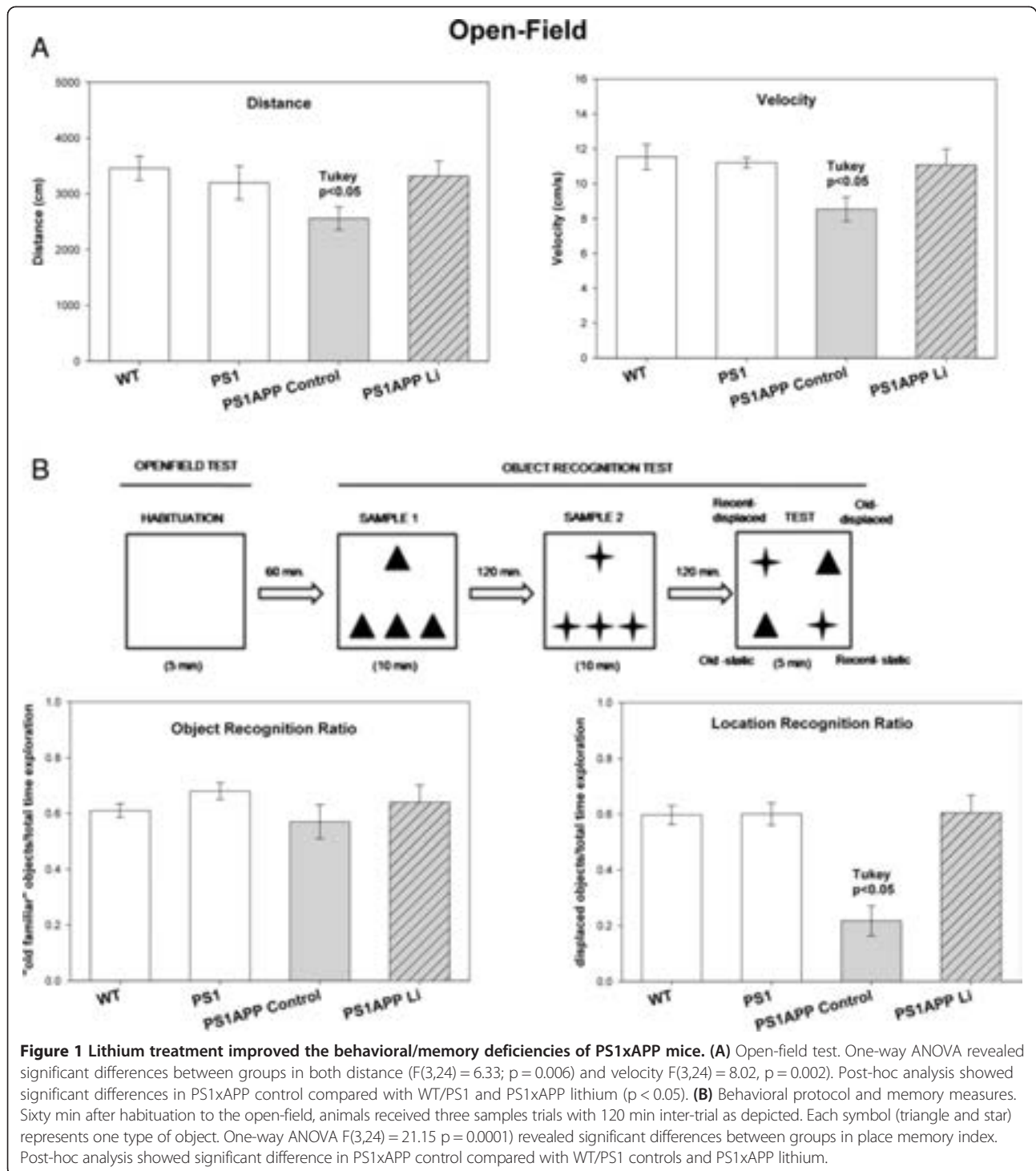
Methods

Transgenic mice and lithium treatment

Generation of PS1M146LxAPP751Swe-London (PS1xAPP) mice has been reported previously [27]. Heterozygous PS1xAPP double transgenic mice (C57BL:6 background) were generated by crossing homozygous PS1 transgenic mice with heterozygous Thy1-APP751SL mice. Only male mice were used in this work.

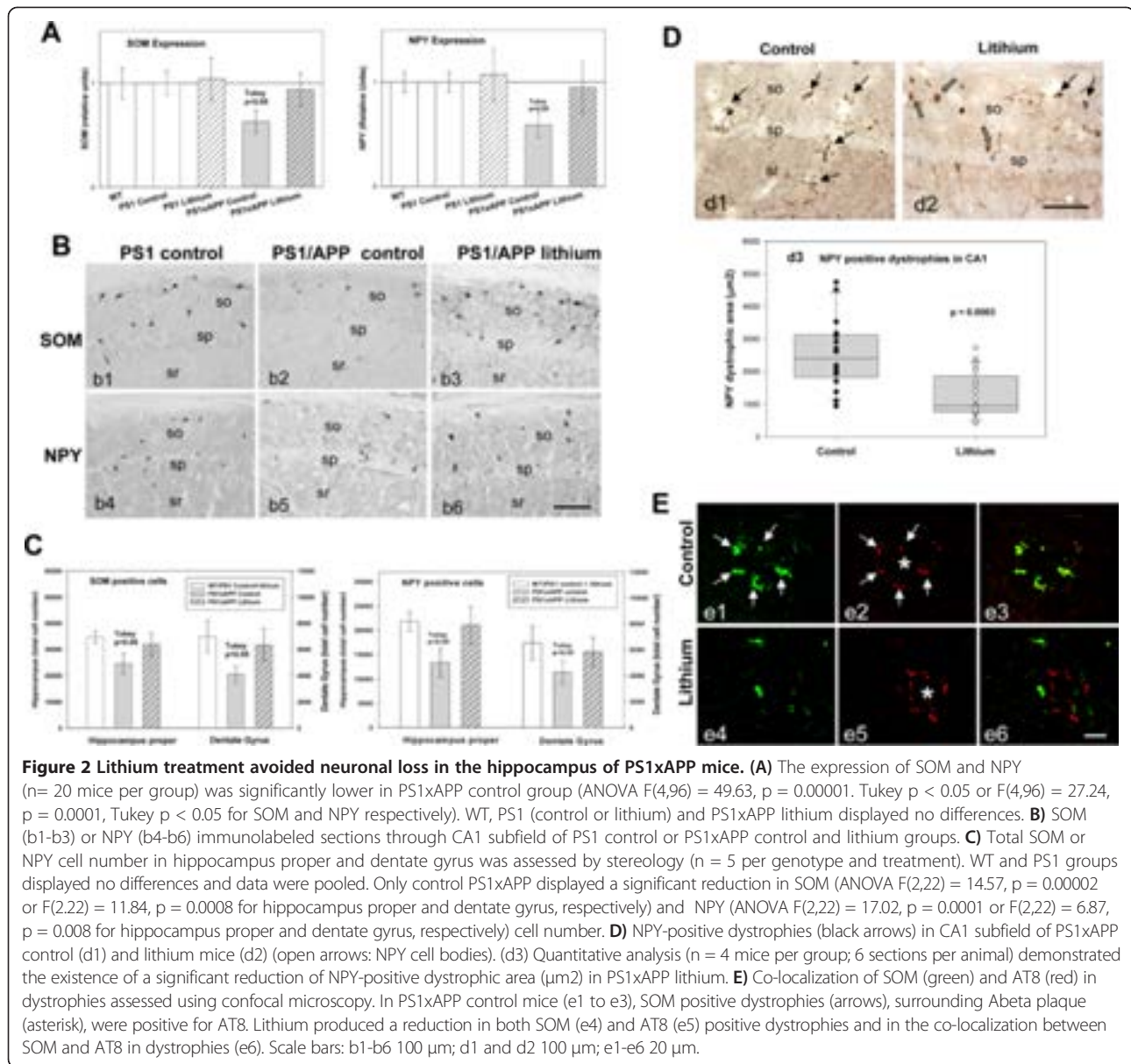
As controls, we used age-matched non-transgenic (C57BL:6) male mice (WT) or hemizygous PS1M146L littermates (PS1). The PS1 mice displayed no apparent differences with WT mice, at the age used in this work [24] (see also Figures 1 and 2A). Only PS1xAPP mice model accumulated Abeta plaques. Thus, to specifically assess the potential therapeutic effect of lithium on the Abeta pathology, we reasoned that PS1 mice would be a better control than WT mice. An additional lithium treated PS1 group was also used as control for lithium treatment.

For lithium treatment, PS1 and PS1xAPP mice (3 month old at the beginning of treatment) were randomly divided into two groups ($n = 25$ each). Mice were fed, ad libitum, with standard mice diet (2014 Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet, Harlan, Spain) or standard mice diet supplemented with lithium carbonate (1.2 g/kg 2014 diet, Harlan, Spain). The lithium group received an additional drinking bottle containing NaCl (0.7%). The treatment was continued for 6 months. The control and treated mice were weighted weekly and no significant weight loss was detected (29.20 ± 1.09 g vs 27.5 ± 2.2 g for control and Li-treated PS1xAPP mice, respectively). For the plasmatic Li content, mice were bled (100 μ l) from the ocular artery. The plasmatic lithium levels were stable during the treatment and also were within the therapeutic range: 0.44 ± 0.07 mEq/L ($n = 10$) after 71 days of treatment or 0.38 ± 0.05 mEq/L ($n = 10$) at the end of treatment. This treatment was well tolerated with a low mortality during this period. (PS1 control 0%; PS1 lithium, 0%; PS1xAPP control, 20%; PS1xAPP lithium, 7.4%).



After behavioral tests, control and lithium-treated mice were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg), and transcardially perfused with 0.1 M phosphate buffered saline (PBS). Then, mice brain was quickly removed and one hemisphere dissected (cortex and hippocampus), frozen and stored at -80°C while the other hemisphere was fixed by immersion

with 4% paraformaldehyde, 75 mM lysine, 10 mM sodium metaperiodate in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4 for 5 days at 4°C . Fixed hemibrains were cryoprotected in 30% sucrose, sectioned at $40\ \mu\text{m}$ thickness in the coronal plane on a freezing microtome and serially collected in wells containing cold PBS and 0.02% sodium azide.



All animal experiments were performed in accordance with the animal research regulations (RD53/2013 and 2010/63/UE) from Spain and European Union, and with the approval of the Committees of Animal Research from the University of Seville (Spain) and the University of Malaga (Spain).

Behavioral studies

All experiments were conducted on age-matched male WT (n = 10), PS1 (n = 10), PS1xAPP control (n = 9) and PS1xAPP lithium-treated (n = 9) mice. Mice were tested at 9 month of age, two days previous to sacrifice. All testing were performed in the light period of the light/dark cycle and the experimenter was blind to the genotypes and

treatment of mice. Animals were adapted to the experimental conditions for 6 days before behavioral testing. All mice were moved to the testing room in their home-cage and kept in the room during 1 hour to habituate to the new location; then, they were handled gently each day briefly in order to minimize non-specific stress. The behavioral experiment protocol was conducted as shown in Figure 1.

Open-field test

Besides the use of the open-field to habituate animals to the cage before the object recognition test, we examined motor function by means of spontaneous locomotor activity [28]. In this test, mice were placed in the centre of a square-shape arena (45 cm × 45 cm) and were allowed

to explore the arena for 5 minutes. The arena was thoroughly cleaned with 70% ethanol solution after each trial. The locomotor activity was measured by an automated monitoring system (Ethovision, Noldus, The Netherlands). Distance travelled and velocity was quantified.

Object recognition test

The object recognition test is based in the natural tendency of rodents to explore objects (spontaneous exploratory behavior). In the present study, we used a modified protocol [29] based in the preference for the “old familiar object” over the “recent familiar object” and the preference for a novel location. Sixty minutes after habituation to the open-field, animals were first exposed to four identical objects arranged in a triangle shaped configuration and allowed to explore them for 10 minutes (Sample 1). After a delay of 2 hours, the mice received a second sample trial identical to the first, except that a novel set of four identical objects were present (Sample 2). The test trial started after 2 hours interval and lasted for 5 minutes. In the test trial, two objects from both samples 1 and 2 (“old familiar” and “recent familiar” objects, respectively) were arranged in a quadratic shape configuration, so one old object and one recent object were present in a familiar position while the other two were displaced to a new position (see Figure 1B for details). The type of object used as “old” and “recent” was counterbalanced across mice. All objects were made of plastic to prevent material preference and for an easier cleaning to prevent odor cues. The two sets of objects were different in size, form and color. The arena and objects were thoroughly cleaned with 70% ethanol solution after each trial. The time spent by the mice exploring each object was analyzed observationally. Indeed, the basic measure was the time spent by the mice exploring objects during the sample phases and during the test trial. Additionally, two discrimination indexes were calculated for the test trial: an object recognition ratio (total time exploring “old familiar” objects/total time exploration) and a location recognition ratio (total time exploring displaced objects/total time exploration). The time was recorded only when the mice touched the object with its nose or forepaws. Turning around, walking over the object, rearing above the object or resting close to the object was not deemed to be exploration. Moreover, locomotor activity was also measured with the software Ethovision XT 7.0 (Noldus, The Netherlands).

RNA and total protein extraction

Total RNA from mice hippocampi was extracted using Tripure Isolation Reagent (Roche) as described previously [23,24,30,31]. After isolation, RNA integrity was assessed by agarose gel electrophoresis. The yield of total RNA was determined by measuring the absorbance (260:280 nm)

of isopropanol-precipitated aliquots of the samples. The recovery of RNA was comparable in all studied groups (1.2-1.5 µg/ mg of tissue). The protein pellets, obtained using the Tripure Isolation Reagent and isopropanol-mediated precipitation, were resuspended in 4% SDS and 8 M urea in 40 mM Tris-HCl, pH 7.4 and rotated overnight at room temperature to get complete protein solubilization.

Retrotranscription and real-time RT-PCR

Retrotranscription (RT) was performed using random hexamers, 4 µg of total RNA as template and High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) following the manufacturer recommendations [24,30]. For real time RT-PCR, commercial Taqman™ probes (Applied Biosystems) were used for amplification. PCR reactions were carried out using either ABI Prism 7000 or 7900HT sequence detector systems (Applied Biosystems). A standard curve was first constructed for every assay, using increasing amounts of cDNA. In all cases, the slope of the curves indicated optimal PCR conditions (slope 3.2-3.4). The cDNA levels of the different mice were determined using GAPDH as housekeeper. Therefore, GAPDH amplification was done in parallel with the gene to be analyzed, and this data used to normalize target gene results.

Independently of the analyzed gene, results were always expressed using the comparative Ct method, following the Bulletin number 2 from Applied Biosystems. As a control condition, we selected 9 month-old WT mice with control diet. In consequence, the expression of all tested genes, for all ages and mice types, was referenced to the expression levels observed in this group.

Antibodies

For this study the following primary antibodies were used: anti-Neuropeptide Y (NPY) rabbit polyclonal (1:5000, Sigma); anti-Somatostatin (SOM) goat polyclonal (1:1000, Santa Cruz Biotechnology); anti-Abeta (clone 6E10) mouse monoclonal (1:5000, Signet); anti-oligomeric amyloid-beta OC rabbit polyclonal (1:5000, Millipore); anti-Abeta42 rabbit polyclonal (1:5000, Abcam); anti-phospho-tau pSer202/Thr205 mouse monoclonal (clone AT8) (1:250, Pierce); anti-microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) rabbit polyclonal (1:500, Cell Signaling); anti-GFAP rabbit polyclonal (1:10000, Dako); anti-ubiquitin rabbit polyclonal (1:5000, Dako); anti-Hsp70 rabbit polyclonal (1:5000, Neomarkers) anti-Hsp60 mouse monoclonal (1:1000, Santa Cruz, Biotechnology), anti-Hsp27 rabbit polyclonal (1:1000, Sigma).

Western blot

Western blots were performed as described [32]. Briefly, 5–20 µg of proteins from the different samples were loaded on 16%-SDS-tris-tricine-PAGE or 12%-SDS-tris-glycine-PAGE and transferred to nitrocellulose (Hybond-C

Extra; Amersham). After blocking, using 5% non-fat milk, membranes were incubated overnight, at 4°C, with the appropriate antibody. Membranes were then incubated with the corresponding horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibody (Dako, Denmark) at a dilution of 1:8000. Each blot was developed using the ECL-plus detection method (Amersham) and quantified using Image-Quant Las 4000 mini gold (GE Healthcare Bio-Sciences). For normalization purposes, proteins were first estimated by Lowry and protein loading corrected by beta-actin. In each experiment, the intensity of bands from PS1 control fed were averaged and considered as 1 relative unit. Data were always normalized by the specific signal observed in PS1 control group.

Immunohistochemistry

Serial sections from control and lithium-treated transgenic mice (n = 6 per group) were processed in parallel for immunostaining using the same batches of solutions to minimize variability in the immunohistochemical labeling conditions. Free-floating sections were first treated with 3% H₂O₂/10% methanol in PBS, pH 7.4 for 20 min to inhibit endogenous peroxidases, and with avidin-biotin Blocking Kit (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) for 30 min to block endogenous avidin, biotin and biotin binding proteins. Sections were immunoreacted with the primary antibody over 24 or 48 h at room temperature. The tissue bound primary antibody was then detected by incubating for 1 h with the corresponding biotinylated secondary antibody (1:500 dilution, Vector Laboratories), and then followed by incubating for 90 min with streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich) diluted 1:2000. The peroxidase reaction was visualized with 0.05% 3-3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma-Aldrich) and 0.01% hydrogen peroxide in PBS. Except for Aβ₄₂ immunolabeling, the chromogen solution contained 0.03% nickel ammonium sulphate for a blue reaction product. For double NPY-6E10 immunohistochemical labeling sections were first incubated with anti-NPY as described above. After the DAB-nickel reaction (dark blue end product), sections were incubated with anti-6E10 antibody. The second immunoperoxidase reaction was developed with DAB only (brown reaction end product). After DAB, sections immunolabeled for Ubiquitin or LC3 antibodies were incubated 3 min in a solution of 20% of Congo red. Sections were then mounted on gelatin-coated slides, air dried, dehydrated in graded ethanol, cleared in xylene and coverslipped with DPX (BDH) mounting medium. Specificity of the immune reactions was controlled by omitting the primary antisera.

For double or triple immunofluorescence labelings, sections were first sequentially incubated with the indicated primary antibodies followed by the corresponding Alexa 488/568/405 secondary antibodies

(1:1000; Invitrogen). GFAP- and OC-immunolabeled sections were stained with 0.02% thioflavin-S in 50% ethanol for 5 min. Sections processed for immunofluorescence were mounted onto gelatin-coated slides, coverslipped with 0.01M PBS containing 50% glycerin and then examined under a confocal laser microscope (Leica SP5 II).

Stereological analysis

Immunopositive cells for SOM or NPY belonging to control and lithium-treated animal groups (n = 5 per group) were stereologically quantified in hippocampus proper and dentate gyrus of hippocampus according to the optical fractionator method. Briefly, the quantitative analyses were performed using an Olympus BX61 microscope interfaced with a computer and an Olympus DP71 digital camera, and the NewCAST (Computer Assisted Stereological Toolbox) software package (Olympus, Denmark). Cell counting was done through the rostrocaudal extent of the hippocampus (between -0.94 mm anterior and 3.64 mm posterior to Bregman coordinates). Neurons were quantified in every seventh section (with a distance of 280 μm), and an average of 6–7 sections was measured in each animal. CA and dentate gyrus boundaries were defined according a standard mouse stereotaxic brain atlas using a 4x objective and the number of neurons was counted using a 100x/1.35 objective. We used a counting frame of 1874.2 μm² with step lengths of 78.93 × 78.93 μm. The total cell number was estimated using the optical fractionators formula, $N = 1/ssf \times 1/asf \times 1/hsf \times \sum Q^-$, where *ssf* represents the section sampling fraction, *asf* is the area sampling fraction, which is calculated by dividing the area sampled with the total area of the layer, *hsf* stands for the height sampling fraction, which is calculated by dividing the height sampled (10 μm in this study) with the section thickness, and $\sum Q^-$ is the total count of somatic profiles counted for the entire area. The precision of the individual estimations is expressed by the coefficient of error (CE) using the following formula: $CE = 1/Q \times (3A - 4B + C/12)^{1/2}$, where $A = \sum Qi^2$, $B = \sum Qi \times Qi + 1$, $C = \sum Qi \times Qi + 2$. The CEs ranged between 0.07 and 0.1. An investigator who was blind to the experimental conditions performed neuronal profile counting.

Plaque size

To determine the size of the plaques, anti-Aβ₄₂ immunostained sections from control and lithium-treated mice (n = 6 per group) were analyzed using the nucleator method with isotropic probes by the NewCAST software package from Olympus stereological system. CA1 subfield was analyzed using a counting frame of 7155.3 μm². For individual plaque measurement a 40x objective was used. Number of plaques/mm² falling into surface categories (ranging from <200 μm² to >2000 μm²) was calculated. Each analysis was done by a single examiner blinded to sample identities.

NPY dystrophic neurites loading

NPY immunostained sections from control and lithium-treated animals were observed under a Nikon Eclipse 50i microscope using a 10x objective and CA1 images were acquired with a Nikon DS-5M high-resolution digital camera. The camera settings were adjusted at the start of the experiment and maintained for uniformity. Digital images (5 sections/mouse) from control and treated mice (n = 6 per group) were analyzed using Visilog 6.3 analysis program (Noesis, France). The area occupied by the NPY-positive dystrophic neurites was identified by level threshold which was maintained throughout the experiment for uniformity. The CA1 area in each image was manually outlined and the positive somata were removed by manual editing. The area occupied by NPY dystrophies was estimated and defined as (sum dystrophies area measured/sum CA1 area analyzed) × 100. The mean and standard deviation (SD) of the dystrophies area were determined using all the available data. Quantitative comparisons were carried out on sections processed simultaneously using same batches of solutions.

NPY dystrophies associated to plaques

The area of NPY dystrophic neurites intimately associated to plaques of different sizes (<200 μm², 200–500 μm², 500–2000 μm² and >2000 μm²) was measured in double 6E10/NPY immunostained CA1 sections from control and lithium-treated animals. Images were photographed using a 20x objective with a Nikon Eclipse 50i microscope coupled to a Nikon DS-5M high-resolution digital camera. Digital images (5 sections/mouse) from control and lithium-treated animals (n = 3 per group) were analyzed using Visilog 6.3 analysis program (Noesis, France) to determine the NPY dystrophies area associated to each plaque size group.

Plaque compaction analysis

Abeta42 immunostained hippocampal sections from control and lithium-treated animals were observed under a Nikon Eclipse 50i microscope and CA1 plaques were photographed using a 10x objective. Images were acquired with a Nikon DS-5M high resolution digital camera. The camera settings were adjusted at the start of the experiment and maintained for uniformity. Digital images (5 sections/mouse, n = 5 per group) were analyzed using Visilog 6.3 analysis program (Noesis, France). Abeta42 staining density was identified by bright-level threshold, the level of which was maintained throughout the experiment for uniformity. The gray-scale image was converted to a binary image for estimating the optical density which was defined as pixel units and related with the plaque size (μm² which area was measured using the same program). Quantitative comparisons were performed on sections processed at the same time.

Oligomeric plaque halo

To analyze the oligomeric Abeta halo located at the periphery of the plaques, 40 μm floating sections were first stained with Thioflavin-S and then followed by an antibody specific to oligomers of Abeta (OC antibody; 1:5000) visualized with anti-rabbit Alexa568-conjugated secondary antibody (Invitrogen A10042; 1:1000). Images of 1,024 × 1,024 pixels were acquired by using a Leica SP5 II confocal laser microscope. A total of 15 plaques per animal were randomly photographed in CA1 subfield of control and treated animals (n = 3 per group). Laser settings were adjusted at the start of the experiment and maintained for uniformity. Images were analyzed using LAS AF Lite program (Leica). Plaque area was determined for Thioflavin-S staining (plaque core in green color) and OC immunostaining (oligomeric Abeta in red color) and the difference between the OC area and the core area was considered as the oligomeric halo surrounding plaques.

Statistical analysis

Normality of data was first assessed by using Kolmogorov-Smirnov test. Normally distributed data were expressed and represented as mean ± SD. Non-normal distributed data were represented using box-plot. For normally distributed data, means were compared using ANOVA followed by Tukey test (more than two groups) or t-test (for two group comparisons). Non-normal data were compared by Wilcoxon (for two groups) or Kruskal-Wallis tests (more than two groups). The significance was set at 95% of confidence. Fit and comparison of linear regression was done using multiple regression analysis followed by conditional sum of squares. In all cases Statgraphics plus 3.1 was used.

Results

Lithium treatment rescued behavioral/memory deficits

First, we tested whether lithium administration was able to improve the behavioral/memory deficiencies observed in the 9 month-old control PS1xAPP transgenic model. From the different tasks performed (i.e. Morris water maze), only open-field and novel object recognition showed statistical differences between PS1xAPP and WT or PS1 control mice. No differences between WT and PS1 mice were observed.

In the open-field test, control PS1xAPP mice displayed significant lower activity than either WT or PS1 mice (Figure 1A). There was a significant reduction in both total distance and velocity. No significant differences were observed in time in the periphery or center of the field, or in the immobility periods (data not shown). Also, no differences between PS1xAPP and control groups were observed in fecal boli depositions (not shown). Thus, the PS1xAPP mice were hypoactive as reported in other AD models, such as the 3xTg-AD [28]. As we shown, this mild

form of apathy in PS1xAPP mice was totally relieved after lithium treatment (Figure 1A).

We next evaluated the episodic-like memory using novel object recognition tests. These tests are based on the preference for the “old familiar object” over the “recent familiar” object and the preference for a novel location [29]. Although no differences between groups were observed in the object recognition ratio (Figure 1B), control PS1xAPP mice displayed a significant cognitive deficit in object location memory (which is hippocampus-dependent), compared with PS1/WT mice. Remarkably, full recovery of this spatial memory impairment was observed in lithium-treated PS1xAPP mice, which displayed no differences with the control groups (Figure 1B). Therefore, these data indicated that early oral lithium administration prevents the spatial memory deterioration in PS1xAPP mice.

Lithium administration prevented neuronal loss

As we have reported previously, early Abeta deposition in this PS1xAPP model is paralleled by a selective and significant decrease in the number of SOM and NPY positive GABAergic neurons in the hippocampal formation and the entorhinal cortex [23,24], (see also Figure 2A, B and C). Furthermore, SOM/NPY positive cells displayed a prominent axonal pathology (Figure 2D), with multiple dystrophies (positive also for phospho-tau) that surrounded Abeta plaques (Figure 2E). The early and extensive degenerative pathology of the GABAergic cells, including neuronal death, could be used as a surrogate marker to evaluate the neuroprotective effect of lithium at the initial stages of the disease.

We thus analyzed, at the hippocampal formation, the SOM and NPY expression by qPCR; the number of SOM or NPY immunopositive somata, by stereological quantification, and their axonal dystrophy loading. Lithium produced an effective prevention of the neurodegenerative process exhibited by this neuronal population in PS1xAPP mice (Figure 2). In fact, the mRNA expression for both neuropeptides, SOM and NPY, was virtually identical in lithium-treated PS1xAPP mice, as compared with control groups (Figure 2A). Furthermore, stereological determination of the SOM or NPY cell number (Figure 2B and C) further demonstrated the protective effect of lithium on these neurons in hippocampus proper (O-LM cells) and dentate gyrus (HIPP cells). PS1 and WT mice displayed no differences and lithium treatment of PS1 mice did not alter the expression of either SOM or NPY neuropeptides (see Figure 2A) or the number of SOM or NPY positive cells (data in Figure 2C were pooled from WT, PS1 control and lithium groups). For subsequent experiments, only PS1 control and PS1 lithium mice were included.

The same samples were used for the stereological quantification of SOM or NPY cell number at the entorhinal cortex, another early affected brain region. As previously

reported [23], double transgenic mice displayed in this cortical region a significant decrease in the number of both SOM ($4,207 \pm 1,119$ cell/mm³, $n = 4$, vs $8,596 \pm 803$ cell/mm³, $n = 6$, for control PS1xAPP and PS1 mice, respectively, $p < 0.05$; $52.2 \pm 13.1\%$ of reduction) and NPY ($1,770 \pm 227$ cell/mm³, $n = 4$, vs $3,062 \pm 363$ cell/mm³, $n = 6$, for control PS1xAPP and PS1 mice, respectively, $p < 0.05$; $58.4 \pm 7.1\%$ of reduction) immunopositive GABAergic cells. However, after lithium treatment, the number of both neuronal populations did not differ between PS1/APP and PS1 groups ($7,087 \pm 1,097$ cell/mm³ or $3,003 \pm 423$ cell/mm³, $n = 4$, for SOM and NPY, respectively; $17.6 \pm 12.8\%$ or $1.9 \pm 13.8\%$ of reduction).

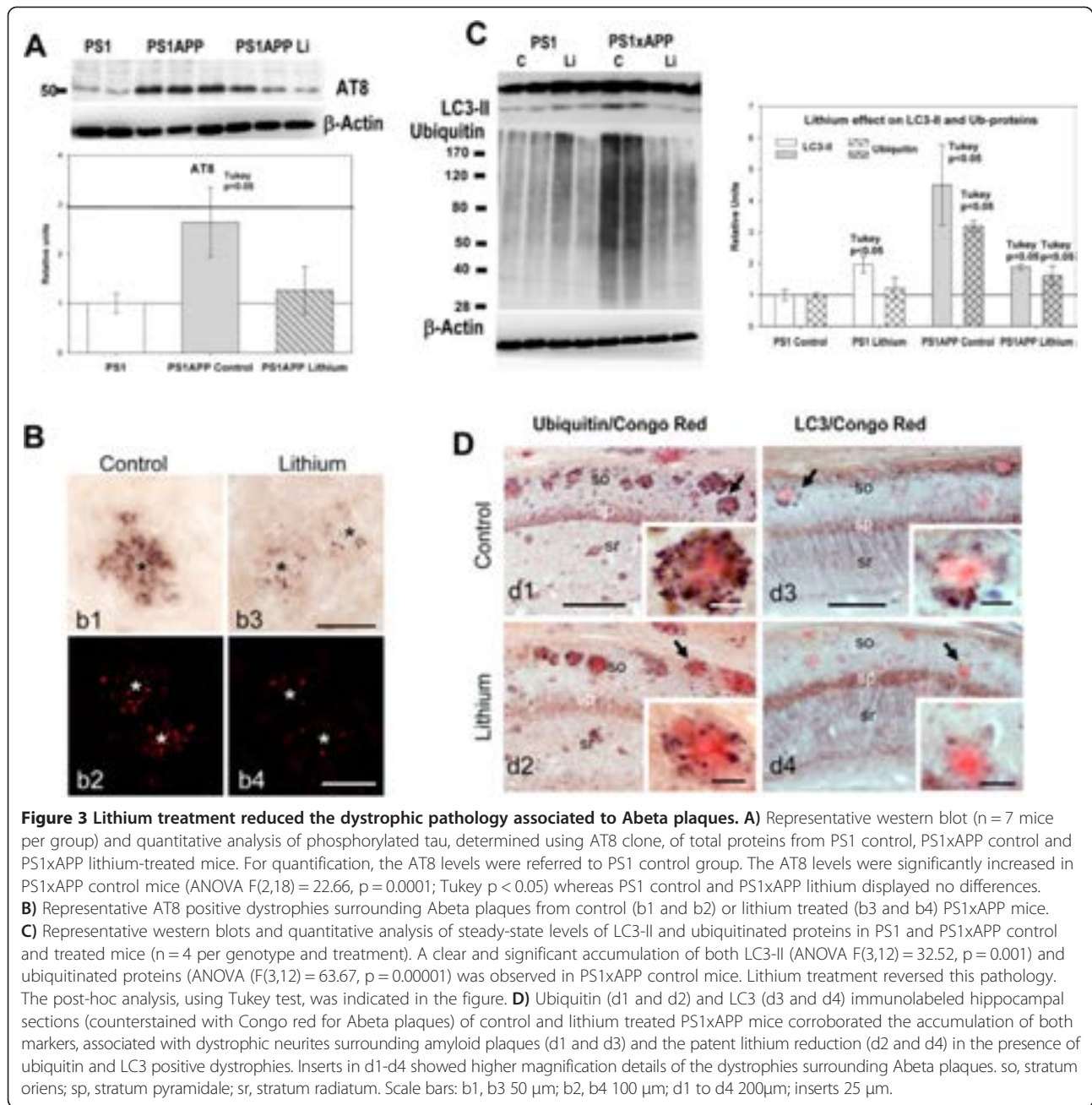
Thus, early lithium intervention was highly effective preventing the SOM/NPY neuronal loss in both the hippocampal formation and the entorhinal cortex of PS1xAPP model.

Another prominent pathological feature of this neuronal population in our PS1xAPP mice is the extensive development of axonal dystrophies associated to Abeta plaques [15] (Figure 2D and E). Importantly, lithium treatment produced, in parallel with the prevention of the SOM/NPY cell loss, a prominent reduction of the axonal dystrophy pathology in these cells. In fact, lithium treated PS1xAPP mice displayed an obvious and highly significant decrease (-60.2%) in the NPY positive dystrophic area (Figure 2D, d1, d2 and d3). Also, there was a decrease in the AT8- and SOM-positive dystrophies (Figure 2E). Therefore, lithium avoided SOM/NPY neurodegeneration and improved the cell integrity, reducing the axonal degeneration of this highly vulnerable neuronal population.

Lithium treatment ameliorated axonal/synaptic pathology by reducing abnormal intracellular protein accumulation

PS1xAPP mice accumulated phospho-tau, LC3-II and ubiquitinated proteins in axonal dystrophies surrounding Abeta plaques (Figure 3; see also [15,16]). Thus, in agreement with the preservation of SOM/NPY neurons, lithium also reduced both the total AT8-positive phospho-tau levels, determined by western blots (Figure 3A), and the AT8-positive dystrophies, detected by immunohistochemistry (Figure 3B). Furthermore, lithium also reduced the steady-state levels of both LC3-II and ubiquitinated proteins (see Figure 3C). In fact, the steady-state levels of both LC3-II and ubiquitinated proteins were similar to those observed in the PS1 lithium group. Immunohistochemistry also demonstrated a dramatic reduction in both ubiquitin- and LC3-positive dystrophies, surrounding the Abeta plaques (Figure 3D, d2 and d4). Thus, lithium reduced the number of dystrophies and the accumulation of intracellular proteins.

This lithium-mediated reduction of the axonal dystrophic pathology could also ameliorate the synaptic degeneration. Thus, we determined (by western blots) the levels of the classic presynaptic marker synaptophysin (not shown).



Control PS1xAPP mice displayed a consistent and significant reduction (0.72 ± 0.12 vs 1.00 ± 0.14 for PS1xAPP and PS1 control, respectively, n = 7 per phenotype, Tukey p < 0.05) whereas a completely recovery was detected in lithium-treated PS1/APP mice (0.96 ± 0.16 for PS1xAPP lithium, n = 9).

Taken together, these data indicated that the chronic lithium treatment markedly reduced the plaque associated axonal dystrophy pathology, in parallel with a reduction on the abnormal intracellular accumulation of proteins and/or autophagic vesicles, in this PS1xAPP model. Furthermore, lithium also decreased the putative

presynaptic degeneration observed in this transgenic mouse model.

Lithium treatment substantially modified the morphology and toxicity of the extracellular Abeta plaques

Next, we tested whether lithium treatment could alter Abeta accumulation in PS1xAPP hippocampus. Data (Table 1) indicated the absence of modifications on either i) total monomeric Abeta (quantified by western blot and 6E10 antibody), ii) soluble Abeta42 (quantified by ELISA using soluble extracts) or iii) Abeta plaque load (determined using either anti-Abeta42 or 6E10

Table 1 Abeta accumulation was not modified in the lithium treated PS1xAPP mice

		Control	Lithium
Soluble Abeta42 (pg/ml)	ELISA	27.57 ± 10.74 n = 7	30.14 ± 6.47 n = 7
Total Abeta (relative units)	Western blots	1.0 ± 0.26 n = 18	0.98 ± 0.60 n = 25
Abeta load (% of area)	Immunohistochemistry	6.83 ± 1.99 n = 5	4.40 ± 1.81 n = 5
Abeta42 load (% of area)	Immunohistochemistry	5.09 ± 2.31 n = 5	3.65 ± 1.03 n = 5

Data are mean ± S.D.

antibodies). However, we did observe a highly significant reduction (−62.7%) in the size of the Abeta plaques in lithium-treated PS1xAPP mice, as compared with PS1xAPP control group (Figures 4A, a1, a2 and quantitatively in a3). In fact, when the distribution of the different sizes of the Abeta plaques was analyzed (Figure 4A, a4), the treated group displayed a marked increase (4 fold) in the number of small plaques (<200 μm²), with the consequent reduction in the number of medium and large size Abeta plaques.

This reduction of plaque size, in absence of a parallel reduction on the total Abeta deposition, could arise of a higher Abeta compaction. Interestingly, higher plaque compaction could reduce the Abeta pathology [33]. We thus determined the plaque compaction by quantifying the optical density of Abeta42 immunostained plaques, randomly selected by the stereological microscope (n = 800 plaques from 5 different sections and 6 different control or treated mice; see [33]). Although the plaque compaction was heterogeneous in both groups (Figure 4B), our data demonstrated the existence of a highly increase (82%) in the plaque compaction (calculated as Pixels/μm²) in the lithium treated PS1xAPP mice (Figure 4B, b5).

The increase in plaque compaction could involve a reduction of the putative toxic oligomeric Abeta that surrounded or aroused from plaques (the plaque “halo”; [34]. To quantitatively determine this possibility, the Abeta plaques were first stained with Thioflavin-S followed by immunostaining with the conformation-specific OC antibody, which recognizes fibrillar Abeta oligomers. Representative double labeled images, and the quantification of the plaque oligomeric halo, is shown in Figure 4C (c1 to c6, and c7, respectively). As expected, lithium treatment produced a significant reduction of the OC-positive plaque halo which might result in less toxic plaques.

To examine the impact of lithium treatment on the toxicity of the Abeta plaques, we quantified the NPY dystrophic area and the corresponding Abeta area in individual plaques. Using unbiased stereological counts

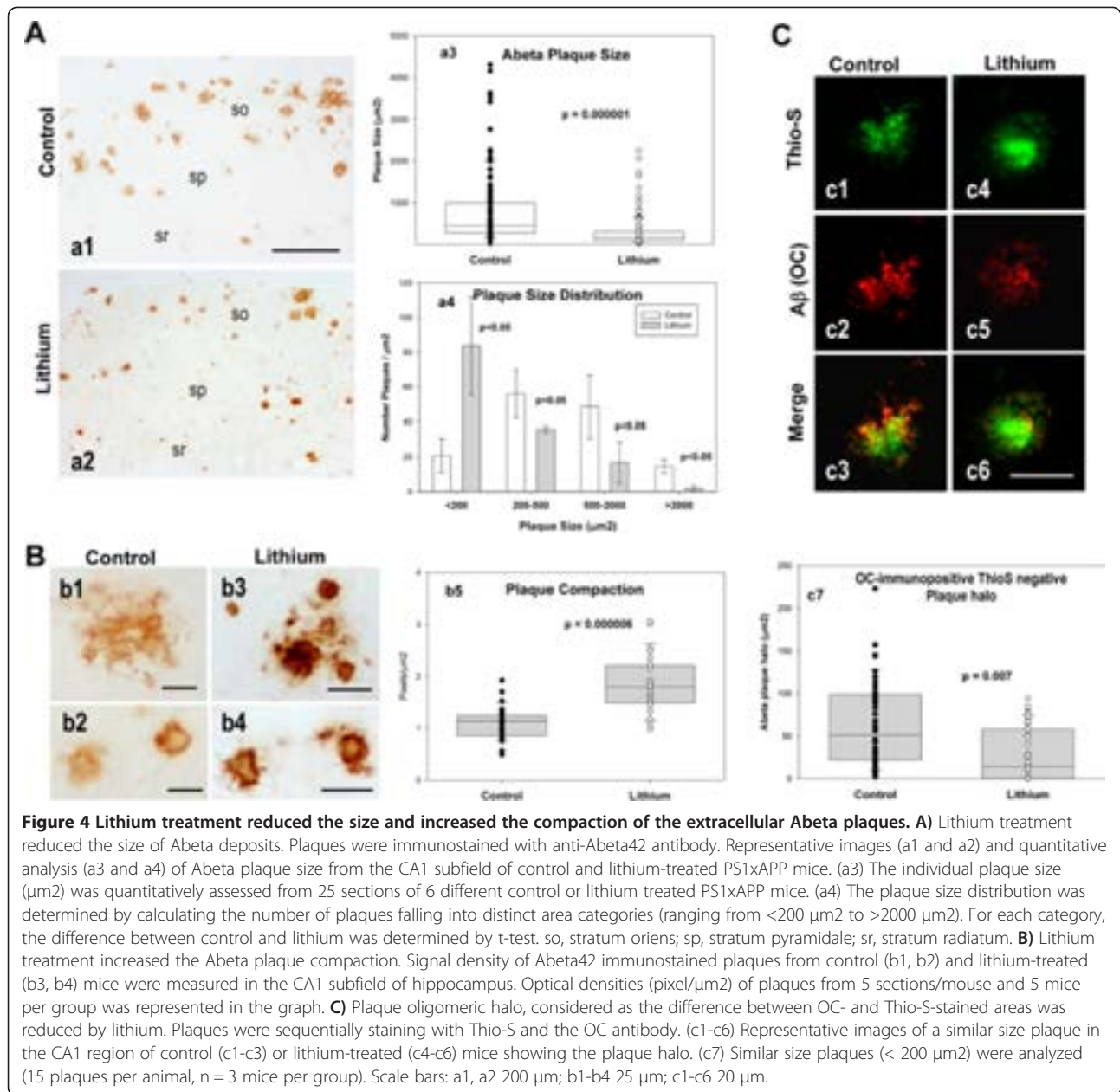
in NPY and 6E10 double immunostained sections (Figure 5A), we first calculated the proportion of Abeta plaques devoid of NPY dystrophies. As shown, treated PS1xAPP mice displayed a small, but significant, increase in the proportion of plaques without associated NPY dystrophies (Figure 5B). More relevant, when the NPY dystrophic area was normalized by the corresponding Abeta plaque area, we observed a substantial reduction of the NPY dystrophic area per plaque in the treated PS1xAPP mice (Figure 5C). Since this reduction of the dystrophic area could just reflect the decrease in plaque size, we also plotted single NPY-dystrophic area versus the corresponding Abeta plaque area, for both control and treated PS1xAPP mice. As expected, we observed a significant positive linear correlation between both parameters in both mice groups (Figure 5D). Importantly, we also observed a significant higher dystrophic area in control PS1xAPP mice across all size of plaques, as compared with treated PS1xAPP mice. In fact, the slope of the fitted linear regression, between dystrophic area versus plaque area, presented a 3-fold decrease after lithium treatment (0.0399 ± 0.006 vs 0.0119 ± 0.0011; for control and lithium PS1xAPP mice; ANOVA F(1,127) = 27.88, p = 0.00001).

Taken together, these data demonstrated that lithium treatment modified Abeta plaques quality decreasing their toxicity measured as the capacity to induce axonal dystrophies formation.

Lithium treatment induced astrocyte activation and the incorporation of Hsps to Abeta plaques

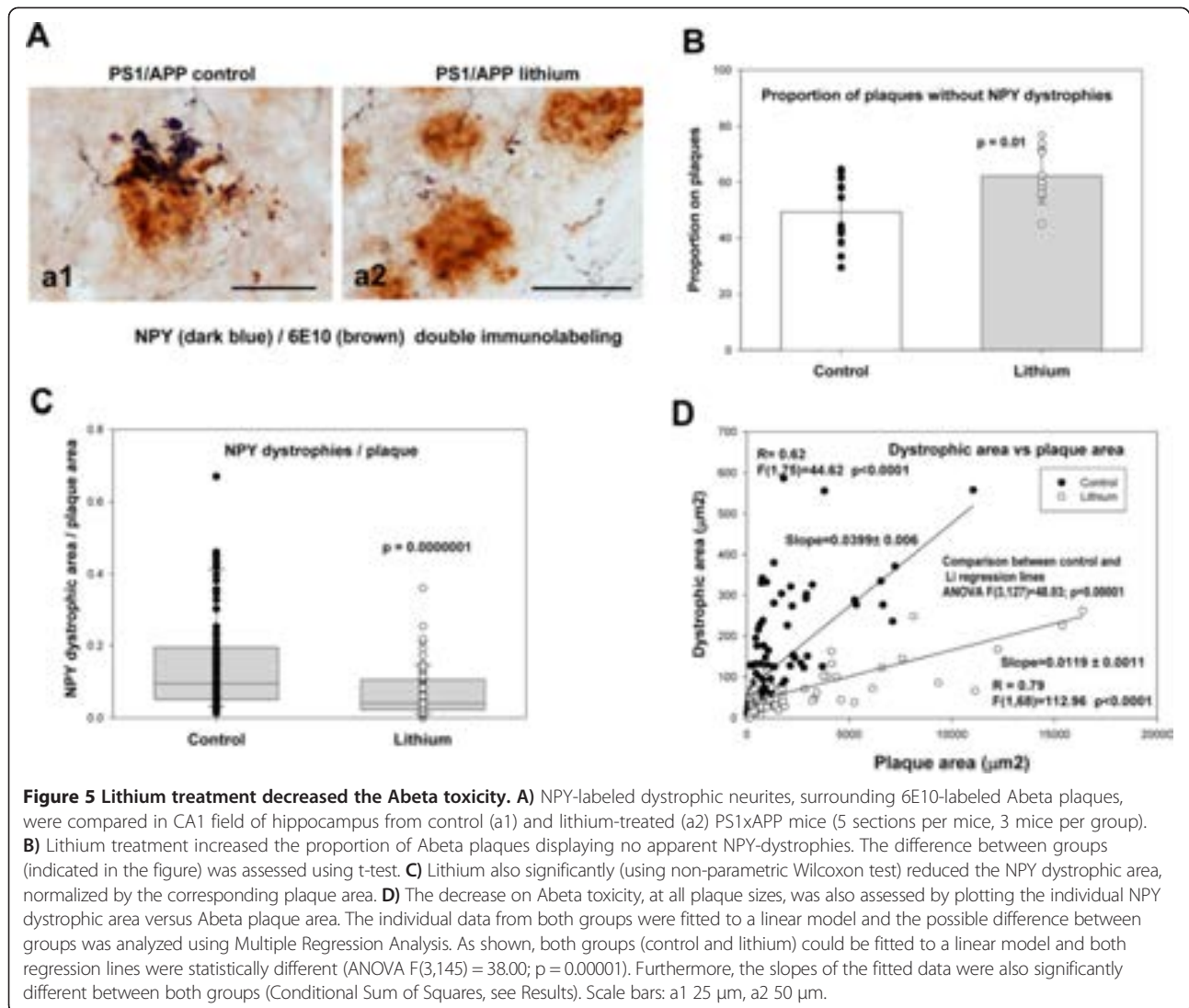
Finally, we investigated the possible implication of astrocytes on this lithium-mediated modification of Abeta plaques. Activated astrocytes, surrounding Abeta, could highly influence the Abeta compaction and plaque aggregation [35–37]. Thus, we evaluated whether lithium affected the astrocyte activation by determining the expression of GFAP by qPCR (Figure 6A) and immunohistochemistry (Figure 6B, b1 to b4). As expected, GFAP expression and astrocyte activation were increased in control PS1xAPP group (as compared with PS1 mice, Figure 6A and B). As also shown, lithium treatment produced a higher increased in GFAP expression (Figure 6A) and also in GFAP activation (compare Figures 6B, b2 and b4). In fact, in the treated PS1xAPP mice, astrocytes were more immunoreactive and clearly hypertrophic, as compared with control PS1xAPP. However, no significant lithium-dependent differences were detected on the expression of other factors, such as NGF, GDNF, NT-5, MMP9, MMP3 or ApoE, (Figure 6C). It is also noteworthy that lithium treatment has no effect on GFAP expression on non-Abeta activated astrocytes (PS1 lithium mice).

Within the different factors and/or processes that could influence Abeta compaction, it has been demonstrated that



extracellular chaperones, such as heat shock proteins (Hsps), have the capacity to reduce the Abeta toxicity by increasing the sequestration/compaction of putative toxic Abeta oligomers [36,38-41]. Furthermore, it has been also demonstrated that astrocytes could express and release different Hsps [36]. Thus, we evaluated whether lithium treatment did affect the Hsps expression. First, we determined, by western blots, the levels of Hsp27, Hsp60 and Hsp70 in PS1xAPP control and lithium treated mice. As shown in Figure 6D, we observed a consistent increase on the levels of all four proteins in the lithium group. However, no changes on expression (by qPCR) were detected (not shown). Moreover, we analyzed the in vivo localization of

Hsp70 (not shown) and Hsp27 (Figure 6E) and whether lithium treatment modified their distribution. Both chaperones displayed similar immunostaining patterns. In lithium treated PS1xAPP mice (Figure 6E e1 to e5), triple labeling experiments demonstrated that anti-Hsp27 intense stained the Abeta plaque core (labeled by 6E10) and, interestingly, also activated astrocytes (GFAP-positive cells) near plaques displayed Hsp-27 immunopositive puncta. However, in control PS1xAPP mice, the core of Abeta plaques appeared weakly immunostained and low or no immunoreactivity was observed in astrocytes surrounding Abeta plaques (Figure 6E, e6-e9).



Although more experiments are clearly needed, these data indicated that lithium, modulating the production/release of Hsps by astrocytes, might decrease the toxicity of plaques by increasing the Abeta compaction.

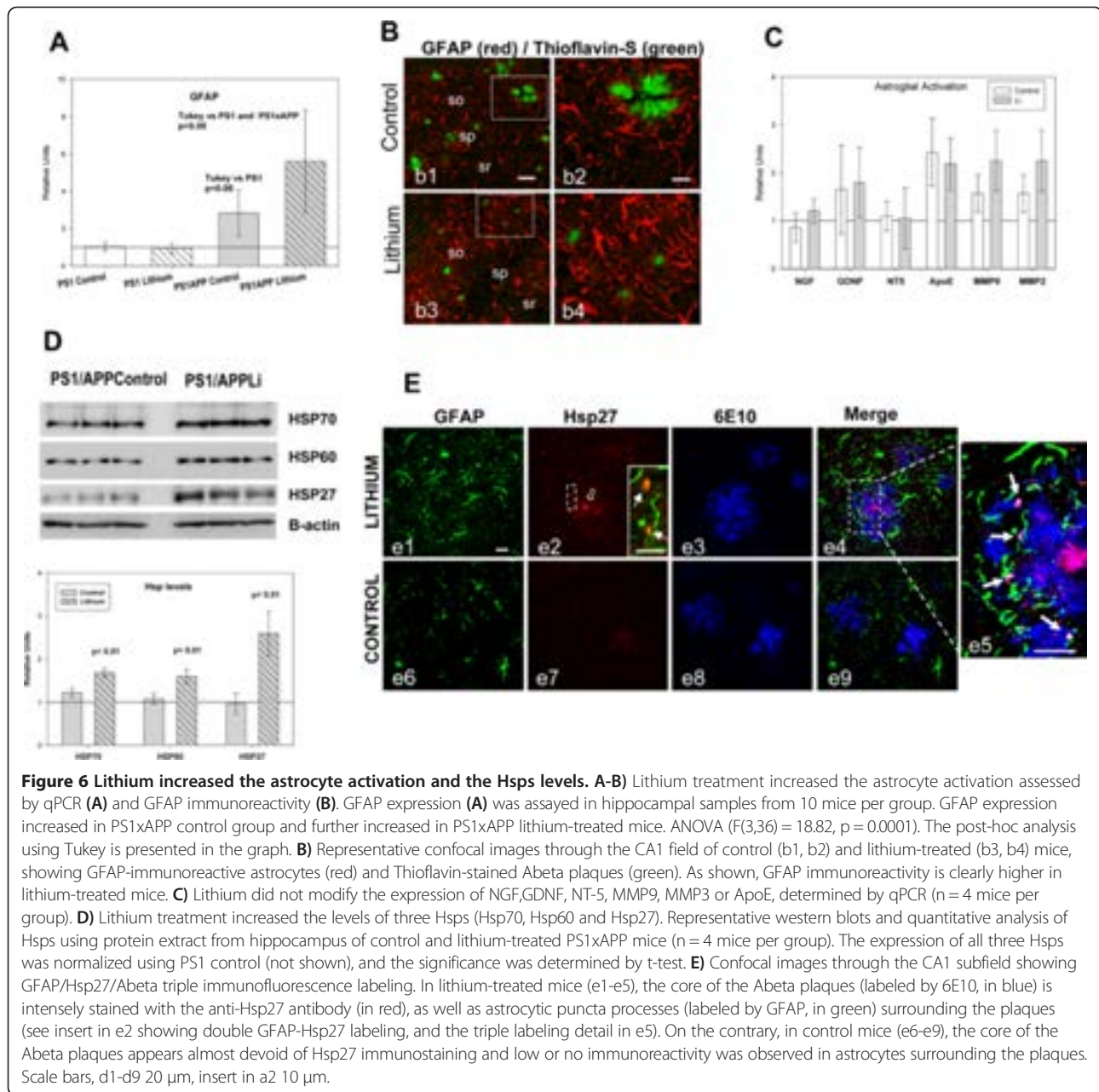
Discussion

Here, we demonstrate that chronic oral administration of lithium, before the pathology onset, resulted in less toxic plaque formation that significantly ameliorated the degenerative processes and behavioral/memory deficits occurring during disease progression in our PS1xAPP model. Specifically, and of great relevance for AD prevention, early lithium intervention was able to arrest neuronal loss in hippocampus and entorhinal cortex of highly vulnerable populations. Beside, lithium substantially reduced the axonal dystrophic pathology, associated to amyloid plaques, by increasing the Abeta compaction. As we discuss below, these neuroprotective

effects of lithium could be mediated by modifications of the plaque toxicity through the astrocytic release of heat shock proteins. On contrary to previous failed clinical studies using lithium, our results highlight the potential use of this compound as a preventive intervention to halt/slow AD pathology progression at preclinical stages.

As we reported previously, our PS1xAPP mouse displays early (6 months) neuronal loss affecting SOM/NPY GABAergic cells in the hippocampal formation and entorhinal cortex, which coincides spatiotemporally with the extracellular Abeta deposition [15,16,23,24,30,31]. In addition, another pathological feature of this AD model is the formation of abundant axonal dystrophies surrounding the Abeta plaques. Dystrophies accumulated phosphorylated tau, ubiquitinated proteins and autophagic vesicles [15,16].

Our data demonstrate that lithium administration, starting before the beginning of the neurodegenerative



processes, avoids the selective neuronal loss of the SOM/NPY cells in both the hippocampus and entorhinal cortex. This is the first report showing that lithium prevents neuronal loss in AD vulnerable brain regions using in vivo studies. Also, our data demonstrate that lithium ameliorates the dystrophic pathology, reducing dramatically the NPY-positive dystrophic area associated to the Abeta plaques and decreasing the levels of abnormally accumulated LC3-II, AT8 and ubiquitinated proteins. Thus, lithium clearly alleviates most of the neuropathological signs of the PS1xAPP model.

As we and others have demonstrated, the PS1xAPP mice display GSK-3beta activation and autophagy/lysosomal deficiencies [15,16,31,42,43]. Lithium could directly affect the neuronal degeneration by inhibiting the GSK-3beta activity (data not shown; [44]) and/or by activating the autophagy-mediated protein degradation [12,45,46]. These effects would reduce the accumulation of phospho-tau, LC3-II and ubiquitinated proteins and, in consequence, reduce the neurodegenerative process. However, the PS1xAPP transgenic model accumulates these proteins in axonal dystrophies surrounding the Abeta plaques. In this sense, we

and others have suggested that the formation of axonal dystrophies might be directly implicated in the neuronal degeneration during disease progression [9,15,16,47,48]. This suggestion agrees with recent data from AD patients [49]. Importantly, quantitative data demonstrate that lithium produced a prominent reduction (~60%) of the NPY-positive dystrophic area. This reduction could also be reflected by the decrease in the abnormal accumulation of phospho-tau, LC3-II and ubiquitinated proteins, associated with the dystrophic pathology, surrounding Abeta plaques.

Therefore, besides a putative direct effect either through GSK-3beta activity or autophagy/lysosomal protein degradation, the lithium-mediated amelioration of the neuropathological alterations may likely reflect the dramatic reduction in the formation of dystrophic neurites around the Abeta plaques. This effect could also reflect the lithium-dependent modifications of the Abeta plaque formation.

As we have shown here, lithium produced a prominent change in plaque morphology and quality. In fact, the Abeta plaques were smaller (see also [20]) and more compact in treated than in control PS1xAPP mice. In this context, it has been reported that the highly aggregated Abeta possesses a reduced toxicity [33,50], and therefore the observed decrease in the dystrophic area per plaque could reflect a reduction in plaque toxicity.

Regarding the plaque toxicity, it has been noted that the formation of axonal dystrophies and the synaptic degeneration seemed to be restricted to the periphery of the Abeta plaques [34,48,50]. This most periphery area (halo) of the plaques might be constituted by partially aggregated Abeta fibrillar oligomers, which could be involved on the AD pathology [51]. In this scenario, our data demonstrate that lithium produces a reduction on the fibrillar oligomeric halo (which is recognized by the conformation specific polyclonal OC antibody) of the Abeta plaques, thus diminishing the plaque toxicity.

The processes contributing in the Abeta aggregation, plaque formation or plaque compaction are actually unknown. It has been suggested that astrocytes could play a prominent role by limiting the plaque growth and the plaque-associated dystrophy formation [35,36]. Moreover, activated astrocytes may release, among different factors, Hsps [52,53], which could induce the Abeta aggregation, reducing its potential toxicity [36,38,40]. In agreement with these data, our results strongly suggest the involvement of astrocytes and extracellular Hsps as mediators of the lithium effect on plaque toxicity. In fact, we demonstrate simultaneous higher astrocyte activation with higher incorporation of Hsps in the Abeta plaques and reduced oligomeric plaque halo in lithium treated PS1xAPP mice, compared with controls. It is noteworthy the lithium-dependent increase of Hsp70 and Hsp27 in the plaque core. Although further experiments should be done, this particular localization

suggests that these Hsps could be implicated in the Abeta nucleation and plaque compaction.

Conclusions

Our data demonstrate that the early chronic lithium treatment significantly ameliorates the pathological progression in this PS1xAPP AD model. Lithium could reduce neuronal/axonal degeneration by increasing the Abeta compaction and, in consequence, producing smaller Abeta plaques with lower toxic halo. Lithium could influence directly neurons but, as we have shown in this work, this compound has a novel therapeutic effect through astrocytes inducing chaperones release which have the capacity to modulate the Abeta compaction/toxicity. To the best of our knowledge, this is the first time that this therapeutic effect of lithium on Abeta plaque quality has been reported. These data reveal a novel lithium-mediated mechanism capable of altering the course of the disease in an amyloidogenic AD model. These Abeta-modifying mechanism might represent an innovative therapeutic approach to the, so far, continuing negative outcomes of AD clinical trials aimed to clear Abeta plaques once they have already formed, and to the current inability to prevent plaques from forming in the first place.

Competing of interests

The authors declare that they have no competing of interests.

Authors' contributions

MT, SJ, VN and MV carried out the molecular experiments; R S-V, L T-E, and E M-S carried out the immunohistochemical experiments; D B-V and I M-G carried the stereological experiments; V DC performed the behavioral analysis; JCD and MV participated in the design of experiment and revising the manuscript, AG and JV design the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This work was supported by Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), from Instituto de Salud Carlos III of Spain, through grants PI12/01439 (to JV) and PI12/01431 (to AG), and by CIBERNED (PI2010/08) to JV and AG. SJ and VDC are the recipients of a contract from CIBERNED. VN and MT were recipients of PhD fellowships from Junta de Andalucía. LTS and ELS were recipients of PhD fellowships (FPU) from Ministerio de Educación Cultura y Deportes. We thank Sanofi for the PS1xAPP model used in this study, and Mercedes Aneiros and Maria Luisa Gracia-Cuervo for their expert technical assistance. Antonia Gutierrez and Javier Vitorica are Co-Senior corresponding authors.

Author details

¹Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071 Málaga, Spain. ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla, Spain. ³Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain. ⁴Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS)-Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain. ⁵Present addresses: Laboratory of Molecular Cell Biomedicine, University of Balearic Islands, Palma, de Mallorca, Spain. ⁶Institute for Memory Impairments and Neurological Disorders, Department of Neurobiology and Behavior, University of California, Irvine, CA, USA. ⁷Mitchell Center for Alzheimer's Disease and Related Brain Disorders, Department of Neurology, University of Texas Medical School at Houston, Houston, Texas, USA.

Received: 7 November 2013 Accepted: 8 November 2013
Published: 12 November 2013

References

- Hardy J, Selkoe DJ: The Amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002, **297**:353–356.
- Wyss-Coray T, Rogers J: Inflammation in Alzheimer Disease's. A Brief Review of the Basic Science and Clinical Literature. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012, **2**:a006346.
- Diniz B, Machado-Vieira R, Forlenza O: Lithium and neuroprotection: translational evidence and implications for the treatment of neuropsychiatric disorders. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2013, **9**:493–500.
- Forlenza O, Paula V, Machado-Vieira R, Diniz B, Gattaz W: Does Lithium Prevent Alzheimer's disease? *Drugs Aging* 2012, **29**:335–342.
- Nunes PV, Forlenza OV, Gattaz WF: Lithium and risk for Alzheimer's disease in elderly patients with bipolar disorder. *B J Psychiatry* 2007, **190**:359–360.
- Young AH: More good news about the magic ion: lithium may prevent dementia. *B J Psychiatry* 2011, **198**:336–337.
- Bhat RV, Budd Haeberlein SL, Avila J: Glycogen synthase kinase 3: a drug target for CNS therapies. *J Neurochem* 2004, **89**:1313–1317.
- Hernandez F, Lucas JJ, Avila J: GSK3 and Tau: two convergence points in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2013, **33**:S141–S144.
- Jin M, Shephardson N, Yang T, Chen G, Walsh D, Selkoe DJ: Soluble amyloid beta protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011, **108**:5819–5824.
- Leroy K, Ando K, Laporte V, Dedecker R, Suain V, Authalet M, et al: Lack of Tau proteins rescues neuronal cell death and decreases Amyloidogenic Processing of APP in APP/PS1 Mice. *Am J Pathol* 2012, **181**:1928–1940.
- Caccamo A, Oddo S, Tran LX, LaFerla FM: Lithium reduces Tau Phosphorylation but not Abeta or working memory deficits in a transgenic model with both plaques and tangles. *Am J Pathol* 2007, **170**:1669–1678.
- Sarkar S, Floto RA, Berger Z, Imarisio S, Cordenier A, Pasco M, et al: Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J Cell Biol* 2005, **170**:1101–1111.
- Sarkar S, Rubinsztein DC: Inositol and IP3 Levels Regulate Autophagy: Biology and Therapeutic Speculations. *Autophagy* 2006, **2**:132–134.
- Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, et al: Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005, **64**:113–122.
- Sanchez-Varo R, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, et al: Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer's mice hippocampus. *Acta Neuropathol* 2012, **123**:53–70.
- Torres M, Jimenez S, Sanchez-Varo R, Navarro V, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, et al: Defective lysosomal proteolysis and axonal transport are early pathogenic events that worsen with age leading to increased APP metabolism and synaptic Abeta in transgenic APP/PS1 hippocampus. *Mol Neurodegener* 2012, **7**:59.
- Yu WH, Cuervo AM, Kumar A, Peterhoff CM, Schmidt SD, Lee JH, et al: Macroautophagy—a novel beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 2005, **171**:87–98.
- Phiel CJ, Wilson CA, Lee VMY, Klein PS: GSK-3[alpha] regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature* 2003, **423**:435–439.
- Su Y, Ryder J, Li B, Wu X, Solenberg P, Brune K, et al: Lithium, a common drug for bipolar disorder treatment, regulates amyloid-beta precursor protein processing. *Biochemistry* 2004, **43**:6899–6908.
- Toledo EM, Inestrosa NC: Activation of Wnt signaling by lithium and rosiglitazone reduced spatial memory impairment and neurodegeneration in brains of an APPswe/PSEN1DeltaE9 mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* 2009, **15**:272–285.
- Feyt C, Kienlen-Campard P, Leroy K, N'Kuli F, Courtoy PJ, Brion JP, et al: Lithium Chloride increases the production of Amyloid-beta Peptide independently from its inhibition of Glycogen Synthase Kinase 3. *J Biol Chem* 2005, **280**:33220–33227.
- Sudduth TL, Wilson JG, Everhart A, Colton CA, Wilcock DM: Lithium treatment of APPswe/DI/NOS2 (-/-) Mice Leads to Reduced Hyperphosphorylated Tau. Increased amyloid deposition and altered inflammatory phenotype. *PLoS ONE* 2012, **7**:e31993.
- Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-estrada L, Sanchez-mejias E, et al: Extracellular Amyloid-beta and Cytotoxic Glial Activation induce significant entorhinal neuron loss in young PS1M146L/APP751SLMice. *J Alzheimers Dis* 2009, **18**:755–776.
- Ramos B, Baglietto-Vargas D, Rio JC, Moreno-Gonzalez I, Santa-Maria C, Jimenez S, et al: Early neuropathology of Somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1 x APP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2006, **27**:1658–1672.
- Chan-Palay V, Lang W, Allen YS, Haesler U, Polak JM: Cortical neurons immunoreactive with antisera against neuropeptide Y are altered in Alzheimer's-type dementia. *J Comp Neurol* 1985, **238**:390–400.
- Davies P, Katzman R, Terry RD: Reduced somatostatin-like immunoreactivity in cerebral cortex from cases of Alzheimer disease and Alzheimer senile dementia. *Nature* 1980, **288**:279–280.
- Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, Planche M, et al: Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with A[beta] deposits in APP/PS1 transgenic mice. *ExpNeurol* 2003, **184**:247–263.
- Filali M, Lalonde R, Theriault P, Julien C, Calon F, Planel E: Cognitive and non-cognitive behaviors in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease expressing mutated APP, PS1, and Mapt (3xTg-AD). *Behav Brain Res* 2012, **234**:334–342.
- Davis KE, Easton A, Eacott MJ, Gigg J: Episodic-like memory for What-Where-Which occasion is selectively impaired in the 3xTgAD mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2013, **33**:681–698.
- Jimenez S, Baglietto-Vargas D, Caballero C, Moreno-Gonzalez I, Torres M, Sanchez-Varo R, et al: Inflammatory response in the Hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *J Neurosci* 2008, **28**:11650–11661.
- Jimenez S, Torres M, Vizuete M, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Trujillo-Estrada L, et al: Age-dependent Accumulation of Soluble Amyloid beta (Abeta) Oligomers reverses the Neuroprotective Effect of Soluble Amyloid Precursor Protein alpha (sAPPalpha) by Modulating Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Akt-GSK-3beta Pathway in Alzheimer mouse model. *J Biol Chem* 2011, **286**:18414–18425.
- Araujo F, Tan S, Ruano D, Schoemaker H, Benavides J, Vitorica J: Molecular and pharmacological characterization of native cortical gamma-aminobutyric acid(A) receptors containing both alpha(1) and alpha(3) subunits. *J Biol Chem* 1996, **271**:27902–27911.
- Cohen E, Paulsson JF, Blinder P, Burstyn-Cohen T, Du D, Estepa G, et al: Reduced IGF-1 Signaling delays age-associated proteotoxicity in mice. *Cell* 2009, **139**:1157–1169.
- Koffie RM, Meyer-Luehmann M, Hashimoto T, Adams KW, Mielke ML, Garcia-Alloza M, et al: Oligomeric amyloid-beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, **106**:4012–4017.
- Kraft AW, Hu X, Yoon H, Yan P, Xiao Q, Wang Y, et al: Attenuating astrocyte activation accelerates plaque pathogenesis in APP/PS1 mice. *FASEB J* 2013, **27**:187–198.
- Ojha J, Masilamani G, Dunlap D, Udoff RA, Cashikar AG: Sequestration of Toxic Oligomers by HspB1 as a Cytoprotective Mechanism. *Mol Cell Biol* 2011, **31**:3146–3157.
- Yin KJ, Cirrito JR, Yan P, Hu X, Xiao Q, Pan X, et al: Matrix Metalloproteinases expressed by astrocytes mediate extracellular Amyloid-beta peptide catabolism. *J Neurosci* 2006, **26**:10939–10948.
- Cascella R, Conti S, Tatini F, Evangelisti E, Scartabelli T, Casamenti F, et al: Extracellular chaperones prevent Abeta-induced toxicity in rat brains. *Biochim Biophys Acta - Molecular Basis of Disease* 2013, **1832**:1217–1226.
- Hoshino T, Murao N, Namba T, Takehara M, Adachi H, Katsuno M, et al: Suppression of Alzheimer's disease-related phenotypes by expression of heat shock protein 70 in mice. *J Neurosci* 2011, **31**:5225–5234.
- Mannini B, Cascella R, Zampagni M, Waarde-Verhagen M, Meehan S, Roodveldt C, et al: Molecular mechanisms used by chaperones to reduce the toxicity of aberrant protein oligomers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012, **109**:12479–12484.
- Narayan P, Meehan S, Carver JA, Wilson MR, Dobson CM, Klenerman D: Amyloid-beta Oligomers are Sequestered by both Intracellular and Extracellular Chaperones. *Biochemistry* 2012, **51**:9270–9276.
- Lee JH, Yu WH, Kumar A, Lee S, Mohan PS, Peterhoff CM, et al: Lysosomal Proteolysis and Autophagy require Presenilin 1 and Are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell* 2010, **141**:1146–1158.
- Yang DS, Stavrides P, Mohan PS, Kaushik S, Kumar A, Ohno M, et al: Reversal of autophagy dysfunction in the TgCRND8 mouse model of

- Alzheimer's disease ameliorates amyloid pathologies and memory deficits. *Brain* 2011, **134**:258–277.
44. J A, Wandosell F, Hernández F: **Role of glycogen synthase kinase-3 in Alzheimer's disease pathogenesis and glycogen synthase kinase-3 inhibitors.** *Expert Rev Neurotherapeutics* 2010, **10**:703–710.
 45. Heiseke A, Aguib Y, Riemer C, Baier M, Schtzi HM: **Lithium induces clearance of protease resistant prion protein in prion-infected cells by induction of autophagy.** *J Neurochem* 2009, **109**:25–34.
 46. Parr C, Carzaniga R, Gentleman SM, Van Leuven F, Walter J, Sastre M: **Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibition Promotes Lysosomal Biogenesis and Autophagic Degradation of the Amyloid- β Precursor Protein.** *Mol Cell Biol* 2012, **32**:4410–4418.
 47. Kandalepas P, Sadleir K, Eimer W, Zhao J, Nicholson D, Vassar R: **Erratum to: The Alzheimer's beta-secretase BACE1 localizes to normal presynaptic terminals and to dystrophic presynaptic terminals surrounding amyloid plaques.** *Acta Neuropathol* 2013, **126**:329–352.
 48. Xie H, Hou S, Jiang J, Sekutowicz M, Kelly J, Bacskai BJ: **Rapid cell death is preceded by amyloid plaque-mediated oxidative stress.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2013, **110**:7904–7909.
 49. Perez-Nievas BG, Stein TD, Tai HC, Dols-Icardo O, Scotton TC, Barroeta-Espar I, *et al*: **Dissecting phenotypic traits linked to human resilience to Alzheimer's pathology.** *Brain* 2013, **136**:2510–2526.
 50. Condello C, Schain A, Grutzendler J: **Multicolor time-stamp reveals the dynamics and toxicity of amyloid deposition.** *Sci Rep* 2011, **1**:19.
 51. Tomic JL, Pensalfini A, Head E, Glabe CG: **Soluble fibrillar oligomer levels are elevated in Alzheimer's disease brain and correlate with cognitive dysfunction.** *Neurobiol Disease* 2009, **35**:352–358.
 52. Renkawek K, Bosman G, de Jong W: **Expression of small heat-shock protein hsp 27 in reactive gliosis in Alzheimer disease and other types of dementia.** *Acta Neuropathol* 1994, **87**:511–519.
 53. Taylor AR, Robinson MB, Gifondorwa DJ, Tytell M, Milligan CE: **Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: Role of signaling kinases.** *Devel Neurobiol* 2007, **67**:1815–1829.

doi:10.1186/2051-5960-1-73

Cite this article as: Trujillo-Estrada *et al*: In vivo modification of Abeta plaque toxicity as a novel neuroprotective lithium-mediated therapy for Alzheimer's disease pathology. *Acta Neuropathologica Communications* 2013 **1**:73.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Anexo 3

Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Del Rio JC, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuite M, Vitorica J, Gutierrez A. (2009). Extracellular amyloid-beta and cytotoxic glial activation induce significant entorhinal neuron loss in Young PS1(M146L)/APP(751SL) mice. *J Alzheimers Dis.*, 18(4):755-776.

Extracellular Amyloid- β and Cytotoxic Glial Activation Induce Significant Entorhinal Neuron Loss in Young PS1^{M146L}/APP^{751SL} Mice

Ines Moreno-Gonzalez^{a,d}, David Baglietto-Vargas^{a,d}, Raquel Sanchez-Varo^{a,d}, Sebastian Jimenez^{b,d,e}, Laura Trujillo-Estrada^{a,d}, Elisabeth Sanchez-Mejias^{a,d}, Juan Carlos del Rio^b, Manuel Torres^{b,d,e}, Manuel Romero-Acebal^{c,d}, Diego Ruano^{b,d,e}, Marisa Vizuete^{b,d,e}, Javier Vitorica^{b,d,e,1} and Antonia Gutierrez^{a,d,1,*}

^aDepartment of Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Spain

^bDepartment of Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Spain

^cServicio de Neurología, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga

^dCentro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Spain

^eInstituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS)-Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Spain

Accepted 29 April 2009

Abstract. Here we demonstrated that extracellular, not intracellular, amyloid- β ($A\beta$) and the associated cytotoxic glial neuroinflammatory response are major contributors to early neuronal loss in a PS1xAPP model. A significant loss of principal (27%) and SOM/NPY (56–46%) neurons was found in the entorhinal cortex at 6 months of age. Loss of principal cells occurred selectively in deep layers (primarily layer V) whereas SOM/NPY cell loss was evenly distributed along the cortical column. Neither layer V pyramidal neurons nor SOM/NPY interneurons displayed intracellular $A\beta$ immunoreactivity, even after formic acid retrieval; thus, extracellular factors should be preferentially implicated in this selective neurodegeneration. Amyloid deposits were mainly concentrated in deep layers at 4–6 months, and of relevance was the existence of a potentially cytotoxic inflammatory response (TNF α , TRAIL, and iNOS mRNAs were upregulated). Moreover, non-plaque associated activated microglial cells and reactive astrocytes expressed TNF α and iNOS, respectively. At this age, in the hippocampus of same animals, extracellular $A\beta$ induced a non-cytotoxic glial activation. The opposite glial activation, at the same chronological age, in entorhinal cortex and hippocampus strongly support different mechanisms of disease progression in these two regions highly affected by $A\beta$ pathology.

Keywords: Alzheimer's disease, amyloid, entorhinal cortex, microglia, neurodegeneration, neuroinflammation, transgenic

INTRODUCTION

Accumulation of extracellular amyloid- β ($A\beta$) deposits, intracellular neurofibrillary tangles (NFTs), and progressive neurodegeneration, the major neuropathological lesions in Alzheimer's disease (AD) brains, occur with a regional and temporal defined pattern in vul-

¹Co-Senior Authors.

*Address for correspondence: Antonia Gutierrez, PhD, Department of Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos, 29071, Málaga, Spain. Tel.: +34 952133344; Fax: +34 952131937; E-mail: agutierrez@uma.es.

nerable brain regions [1]. The entorhinal cortex is affected early by NFTs and $A\beta$ deposits, and then these lesions spread to hippocampal and neocortical areas. Moreover, the earliest neuronal loss is detected in the entorhinal cortex [2]. As a key component of cortico-hippocampal networks, the entorhinal cortex plays an important role in memory processes. Superficial neurons (layers II and III) transfer processed cortical sensory information to the hippocampus via the perforant pathway and then deep entorhinal layers receive back information from CA1 and subiculum. Finally, these deep principal neurons (primarily from layer V) give rise to the major cortical and subcortical projections (for review see [3]). In addition, there are substantial intrinsic connections between deep and superficial layers [3–5]. Then, early entorhinal pathology impairs this continuous information transfer and contributes to the cognitive decline in early phases of AD [6,7].

In AD, certain subpopulations of neurons are particularly affected, and specifically in the entorhinal cortex, a selective layer vulnerability has been reported [2, 8,9]. To study AD-related pathology and the mechanisms underlying neurodegeneration, mice expressing mutated human genes associated with the familial forms of AD are widely used. However, no pyramidal cell loss has been identified in these animal models at the initial stages of the pathology. We have previously reported the early and selective vulnerability of somatostatin/neuropeptide Y (SOM/NPY) interneurons in the hippocampus of a PS1xAPP model [10]. These mice developed $A\beta$ plaques at a very early age [11, 12]. However, hippocampal principal cell loss was detected at 17–18 months of age [10,12,13]. The scarce or delayed neuronal loss in most AD models, despite extracellular/intracellular $A\beta$ accumulation, is not well understood. To address this question, we have recently reported the dual role (neuroprotective/neurotoxic) of microglial activation during the time course of the $A\beta$ -associated neuroinflammatory response in the hippocampus of PS1xAPP mice [14]. In this sense, at early ages the activated microglial cells displayed an alternative phenotype that could explain the limited neuronal loss (see also [15]). However, at advanced ages activated microglia exhibited a classical cytotoxic phenotype that could, probably, be responsible for the principal cell death.

Here, we have analyzed the entorhinal cortex at early ages in this PS1xAPP model. As in human patients, this region is affected earlier than hippocampus with significant loss of principal cells (in deep layers) and SOM and/or NPY interneurons (all layers). This early

neurodegeneration coincided with extracellular, rather than intracellular, accumulation of $A\beta$ and cytotoxic inflammatory response.

MATERIALS AND METHODS

Transgenic mice

The generation and initial characterization of the PS1 and PS1xAPP transgenic (Tg) mouse model has been reported previously [11]. PS1 Tg mice (C57BL/6 background) overexpressed the mutated PS1M146L form under the control of the HMGCoA reductase promoter. PS1xAPP double Tg mice (C57BL/6 background) were obtained by crossing homozygotic PS1 Tg mice with heterozygotic Thy1-APP751SL (Swedish-K670N, M671L- and London-V717I-FAD mutations) mice (Charles River, France). Mice represented F6–F10 offspring of heterozygous Tg mice. Non-transgenic mice of the same genetic background and ages were used as controls. All animal experiments were carried out in accordance with the European Union regulations and approved by the committee of animal use for research at Malaga University.

Anatomical boundaries

The entorhinal cortex was anatomically defined according to previous studies [16,17]. The entorhinal cortex is medially bordered by the parasubiculum and laterally by the perirhinal cortex; rostromedially it is bordered by the piriform cortex, whereas, caudodorsally, it is bordered by the postrhinal cortex. The entorhinal cortex is divided into two main areas, the lateral entorhinal area (LEnt) and the medial entorhinal area (MEnt). In the present study only the LEnt was analyzed and no subdivisions were made. The boundaries of the lateral entorhinal cortex in the mouse brain sections were identified on the basis of their anatomical and cytoarchitectonic features, and using a standard mouse stereotaxic brain atlas [18].

Laser capture microdissection

Anesthetized 4- and 6-month old wild-type and PS1xAPP male mice ($n = 4/\text{type}/\text{age}$) were killed by decapitation and brains were quickly removed and frozen. Brains were cut at 15 μm on a cryostat. Sections were collected onto Superfrost Plus slides (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) and stored at -80°C un-

til use. The identification of lateral entorhinal cortex from brain sections lightly stained with hematoxylin was made according to the mouse brain atlas in stereotaxic coordinates [18]. Laser capture microdissection was performed using a Pix-Cell II instrument from Arcturus Engineering (Mountain View, CA). Cells were captured with the 30 μm laser setting and CapSure LCM Caps (Arcturus). The laser was set to a pulse of 60 mW for 50 ms. Entorhinal cortex and hippocampal stratum oriens were selectively captured from each section. After microdissection, the capture disk was cleared of nonspecifically adhering tissue using a CapSure Cleanup Pad (Arcturus).

RNA extraction and isolation

RNA was extracted using the PicoPureTM RNA isolation kit. Capture disks with isolated material were microcentrifuged and incubated in the extraction buffer during 30 min at 42°C. Then, cell extract was centrifuged and frozen at -80°C. To isolate RNA, cell extracts were treated as indicated by the manufacturer (Arcturus). The integrity and the amount of purified RNA were analyzed using RNA 6000 Pico Assay kit (Agilent Technologies).

Retrotranscription and real-time PCR

The retrotranscription (RT) was done using High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) following the manufacturer's recommendations. The RT-PCR was performed basically as described [10,14] with the following modifications. Due to the low amount of tissue sample, the gene to be quantified (single gene per assay) was pre-amplified before quantitative RT-PCR (see [19]). Briefly, 1 or 5 μL of cDNA (in function of the expression levels of the gene to be quantified) were pre-amplified using 5 or 10 cycles of PCR (94°C for 4 min and 5–10 cycles of 94°C, 40 s, 60°C for 40 s and 72°C for 40 s followed by a final elongation period of 5 min at 72°C) using commercial TaqmanTM primers and Master Mix supplied from Applied Biosystems. After pre-amplification, the expression levels were assessed using the same set of TaqmanTM probes in real-time RT-PCR experiments with an ABI Prism 7000 sequence detector (Applied Biosystems). The specificity of this protocol was always assessed by analyzing the PCR products on a 1.5% agarose gel. Only experiments with a single and correct size PCR product were considered for quantification. On the other hand, the quantitative properties of this approach were also

assessed by constructing concentration curves for each gene analyzed. The cDNA levels of the different mice were determined using β -actin as housekeeper. The amplification of the housekeeper was done in parallel with the gene to be analyzed. The results were normalized using the β -actin expression and the data were expressed with respect to age-matched non-Tg controls (see [14]).

Tissue preparation

After deep anesthesia with sodium pentobarbital (60 mg/kg), 2-, 4- and 6-month-old control (WT), PS1, and PS1xAPP Tg mice were perfused transcardially with 0.1 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 followed by 4% paraformaldehyde, 75 mM lysine, 10 mM sodium metaperiodate in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. Brains were post-fixed overnight in the same fixative at 4°C, cryoprotected in 30% sucrose, and sectioned (40 μm thickness) in the coronal plane on a freezing microtome. Each experiment was composed of 4–6 sets of animals (each one containing one control, one PS1 Tg mouse and one PS1xAPP Tg mouse).

Immunohistochemistry

Serial sections from control (WT) and both Tg mice (PS1 and PS1xAPP) were processed in parallel for light microscopy immunostaining (see [10,14]). Free-floating sections were first treated to inhibit endogenous peroxidases and block endogenous avidin, biotin, and biotin-binding proteins. For immunolabeling sections were incubated with one of the following primary antibodies: anti-somatostatin (SOM) goat polyclonal (1:1000 dilution; Santa Cruz Biotechnology); anti-Neuropeptide Y (NPY) rabbit polyclonal (1:5000 dilution; Sigma); anti-Parvalbumin (PV) rabbit polyclonal (1/5000 dilution, Swant); anti-Calretinin (CR) rabbit polyclonal (1:5000 dilution; Swant); anti-VIP rabbit polyclonal (1:5000 dilution, Acris); anti-NeuN monoclonal antibody (1:1000 dilution; Chemicon); anti-human amyloid- β protein precursor (hA β PP) rabbit polyclonal (1/20000; Sigma); anti-CD11b rat monoclonal (1/150000, Serotec), anti-Iba1 rabbit polyclonal (1:1000 dilution; Wako Chemical GmbH); anti-GFAP chicken polyclonal (1/2000 dilution, Chemicon); anti-YM1 (AMCase) goat polyclonal (1:100 dilution, SantaCruz); anti-iNOS rabbit polyclonal (1:1000 dilution, Transduction Laboratories); anti-tumor necrosis factor α (TNF α) rat monoclonal (1:100 dilution; Abcam); anti-A β mouse monoclonal 6E10 (1:1500 dilu-

tion; Sigma); anti-A β_{1-40} rabbit polyclonal (1:40 dilution; Biosource), anti-A β_{1-42} rabbit polyclonal (1:40 dilution; Biosource), over 24 or 48 hours at room temperature. To retrieve intracellular A β , sections were pre-treated for 7 minutes with 85% formic acid before incubation with the anti-A β antibodies. For general antigen retrieval method sections were previously heated at 80°C for 20 minutes in 50 mM citrate buffer pH 6.0. The tissue-bound primary antibody was then detected by incubating with the corresponding biotinylated secondary antibody (1:500 dilution, Vector Laboratories), and then with streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (1:2000 dilution, Sigma-Aldrich). The peroxidase reaction was visualized with 0.05% 3-3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), 0.03% nickel ammonium sulphate, and 0.01% hydrogen peroxide in PBS. After DAB, sections immunolabeled for TNF α or Iba1 were incubated 3 minutes in a solution of 20% of Congo red. Specificity of the immune reactions was controlled by omitting the primary antisera.

For double SOM/NPY, glial fibrillary acidic protein-inducible nitric oxide synthase (GFAP-iNOS), and hA β PP/6E10 immunofluorescence labelings, sections were first sequentially incubated with the indicated primaries antibodies followed by the corresponding Alexa488/568 secondary antibodies (1:1000 dilution; Invitrogen). For double 6E10-Tomato lectin, sections after 6E10 immunofluorescence labeling were incubated for 1 hour at 37°C with a solution of 5 μ g/ml biotinylated Tomato lectin (Sigma) followed by streptavidin-conjugated Alexa 568 (1:1000; Invitrogen). Sections were examined under a confocal laser microscope (Leica TCS-NT) or Olympus BX-61 epifluorescent microscope.

For 5x multiple immunoperoxidase labeling, sections were first and sequentially incubated with anti-SOM, anti-PV, anti-CR, and anti-VIP (all of them interneuronal markers) as described above. After the DAB-nickel reaction (dark blue end product), sections were then incubated 3 days with anti-NeuN monoclonal antibody (1:1000 dilution; Chemicon). The second immunoperoxidase reaction was developed with DAB only (brown reaction end product). The appropriate controls were performed to avoid any false positive immunostaining due to cross-reactivity between detection systems. To clearly discriminate the different streptavidin-peroxidase reactions, the first one (for interneurons) was always developed with DAB-nickel (dark blue) solution whereas the second one (NeuN) only with DAB (light brown). Moreover, the different

compartment localization of interneuron (cytoplasm) and NeuN (nuclei) epitopes completely guarantee the correct non-overlapped visualization of both reactions and the interpretation of the results. Sections from different animals and ages were processed in parallel using same batches of solutions to minimize variability in immunolabeling conditions.

Thioflavin-S staining

Free-floating sections were incubated for 5 minutes with 0.015% Thio-S (Sigma) in 50% ethanol, and then washed in 50% ethanol, in PBS, mounted onto gelatin-coated slides and coverslipped with 0.1 M PBS containing 50% glycerin and 3% triethylenediamine.

Stereological analysis

Immunopositive cells for SOM, NPY, PV or NeuN belonging to the different animal groups (WT, PS1, and PS1xAPP) ($n = 5-6/\text{age}/\text{group}$) were stereologically quantified (see [10,14]). Briefly, the quantitative analyses were performed using an Olympus BX61 microscope interfaced with a computer and a Olympus DP71 digital camera, and the NewCAST (Computer Assisted Stereological Toolbox) software package (Olympus, Denmark). Cell counting was done through the rostro-caudal extent of the lateral entorhinal cortex (between -2.06 mm anterior and -4.60 mm posterior to Bregman coordinates). Neurons were quantified in every seventh section (with a distance of 280 μ m), and an average of 7–8 sections was measured in each animal. Cortical boundaries were defined according a standard mouse stereotaxic brain atlas [18], in adjacent series of sections stained with cresyl violet. The cortical area was defined using a 4x objective and the number of neurons was counted using a 100x/1.35 objective. We used the optical 3 μ m from the upper surfaces as look-up and those 3–13 μ m from the surfaces as reference sections. The numerical density (ND; cells/mm³) was estimated using the following formula: $ND = \sum Q^- / (\sum a \times h)$, where 'Q⁻' is the number of disector-counted somatic profiles, 'a' is the area of the counting frame (1874.2 μ m²), and 'h' is the height of the optical disector (10 μ m). The precision of the individual estimations is expressed by the coefficient of error (CE) [20] using the following formula: $CE = 1/Qx(3A-4B + C/12)^{1/2}$, where $A = \sum Q_i^2$, $B = \sum Q_i \times Q_{i+1}$, $C = \sum Q_i \times Q_{i+2}$. The CEs ranged between 0.07 and 0.1. An investigator who was blind to the experimental conditions (age, genotype, and marker) performed neuronal profile counting.

Entorhinal cortex volume

We estimated the LEnt volume of WT ($n = 6$) and PS1xAPP mice ($n = 6$) applying the Cavalieri's principle in combination with point counting. This method provides efficient and unbiased volume estimation: $V = a(p) \times d \times \sum Pi$, where ' $a(p)$ ' is the area associated with each sampling point, ' d ' the mean distance between two consecutively studied sections and ' $\sum Pi$ ' is the sum of points hitting. From the complete rostrocaudal set of sections in each animal a 1:7 series was selected for analysis. An average of 7–8 sections was measured in each animal. The CEs of the volume were < 0.07 . Data demonstrated the absence of differences between WT, PS1, and PS1xAPP mice at 6 months of age.

Plaque loading quantification

Thioflavine-S staining was observed under an Olympus BX-61 epifluorescent microscope using FITC filter and 4x objective. Images were acquired with an Olympus DP71 high-resolution digital camera using the Cell-A program. The camera settings were adjusted at the start of the experiment and maintained for uniformity. Digital images (4 sections/mouse) from 4 and 6-month-old PS1xAPP mice ($n = 4/\text{age}$) were analyzed using Visilog 6.3 analysis program (Noesis, France). The plaque area (Thioflavin-S positive) within the entorhinal cortex was identified by level threshold which was maintained throughout the experiment for uniformity. The color images were converted to binary images with plaques and entorhinal cortex layers identified (superficial layers, from I to III; and deep layers, from IV to VI).

The cortical area in each 4x image was manually outlined. The plaque loading (%) for each Tg mouse was estimated and defined as (sum plaque area measured/sum cortical area analyzed) $\times 100$. The sums were taken over all slides sampled and a single plaque burden was computed for each mouse. The mean and standard deviation (SD) of the plaque loading were determined using all the available data. Quantitative comparisons were carried out on sections processed at the same time with same batches of solutions.

Plaque size morphometric analysis

Four coronal sections stained with Thioflavin-S from 4 ($n = 5$) and 6-month old ($n = 5$) PS1xAPP mice were analyzed using the nucleator method with isotrop-

ic probes by the NewCAST software package from Olympus stereological system. Deep entorhinal layers were analyzed using a counting frame of $7528.5 \mu\text{m}^2$ and step length of $194.02 \times 194.02 \mu\text{m}$. For individual plaque measurement a 40x objective was used. Number of plaques/ mm^2 falling into four surface categories (ranging from $< 200 \mu\text{m}^2$ to $> 2000 \mu\text{m}^2$) was calculated. Each analysis was done by a single examiner blinded to sample identities.

Statistical analysis

Data was expressed as mean \pm S.D. The comparison between two mice groups (WT and PS1xAPP mice or PS1, and PS1xAPP Tg mice) was done by two-tailed *t*-test, and for comparing several groups (WT, PS1, and PS1xAPP mice) and ages, we used one-way ANOVA, followed by Tukey post-hoc multiple comparison test (SigmaStat[®] 2.03, SPSS Inc). For both test, the significance was set at 95% of confidence.

RESULTS

The number of SOM and NPY positive interneurons was selectively reduced in the entorhinal cortex of PS1xAPP mice at 6 months of age

We have previously reported that hippocampal dendritic inhibitory SOM/NPY interneurons (OL-M and HIPP cells) were severely affected, whereas PV interneurons were highly resistant in this AD model [10].

Thus, we have first analyzed the possible vulnerability of these interneuronal subsets in the entorhinal cortex, a brain region that is specifically damaged at early stages of this pathology. We have combined specific immunohistochemical detection of SOM and NPY interneurons with unbiased stereological cell counting method, in PS1xAPP, PS1, and WT mice at early ages (2, 4, and 6 month-old). SOM-positive non-pyramidal somata were found in cortical layers II–VI of entorhinal cortex (Fig. 1A, a1) and showed multipolar morphology with several primary dendritic processes immunolabeled (Fig. 1A, a3). These SOM-positive cells have profuse axonal arborisation throughout cortical layers I to VI, being denser in layer I. Qualitative assessment of PS1xAPP mice immunolabeled sections indicated a robust loss of SOM-positive cells at 6 months of age (Fig. 1A, a2), when compared to the age-matched WT (Fig. 1A, a1) or PS1 mice (not shown). In addition, the morphological examination showed the presence

of numerous SOM-positive dystrophic neurites in the double Tg mice, many of them associated with A β plaques (Fig. 1A, a4). However, no aberrant neurites were detected in PS1 Tg mice (not shown) or control group (Fig. 1A, a1 and a3). The stereological study (Fig. 1B) demonstrated a significant decrease ($56.20 \pm 8.09\%$, $n = 6$; Tukey $p < 0.001$) in the numerical density (neurons/mm³) of SOM-positive cells in PS1xAPP mice at 6 months of age. The PS1 group did not showed changes.

In order to determine if there was a preferential lamina selective neuronal loss, we have also stereologically counted this GABAergic population in the superficial (I-III) and deep (IV-VI) layers of same 6-month-old PS1xAPP and WT groups. Data demonstrated the existence of homogeneous reduction of SOM-positive cell density through cortical laminae ($51.51 \pm 17.30\%$ in the superficial layers versus $51.16 \pm 19.42\%$ in the deep layers; $n = 6$, two tailed t-test $p \leq 0.005$). Furthermore, we found a parallel decrease in the SOM and VGAT mRNA expression, as assessed by quantitative real time RT-PCR (qPCR) from laser microdissected samples ($-26.11 \pm 13.53\%$, $n = 4$, Tukey $p < 0.05$ and $-34.23 \pm 21.33\%$, $n = 4$, Tukey $p < 0.05$, for SOM and VGAT, respectively).

It could be argued that the observed decrease in the SOM cell density was widespread through the central nervous system in this particular PS1xAPP model and irrelevant to the A β pathology. Thus, we have also quantified this interneuron population in the auditory cortex, a neocortical region less affected by A β pathology (not shown) and in the striatum (non-A β plaques) of the same 6 month-old PS1xAPP mice population. In the auditory cortex we observed a lower decrease of $34.59 \pm 7.91\%$ ($n = 3$; two tailed t-test $p < 0.05$) whereas no significant changes were detected in striatal SOM interneurons, as compared with age-matched control mice. The reduction in the hippocampus for these inhibitory cells was between 50–60%, being CA1 and dentate gyrus the most affected areas [10]. Therefore, SOM-positive cells are preferentially affected in regions (hippocampus and entorhinal cortex) showing a profuse A β pathology and also severely affected in AD patients.

In the hippocampus of this model, the most damaged SOM population also co-expressed NPY neuropeptide [10]. Extensive co-localization of SOM and NPY was also reported in the cerebral cortex [21–25]. Therefore, we also analyzed the NPY-positive population by immunohistochemistry. As shown (Fig. 1A, a5–a8), NPY-immunoreactivity was present in non-pyramidal

cell bodies and fibers in all layers of the entorhinal cortex. Neuronal somata were immunolabeled whereas proximal dendrites were usually weakly immunostained (see Fig. 1A, a7). The number of NPY-positive somata, observed in control animals, was clearly inferior when compared to SOM-positive somata (Fig. 1A, a5 vs a1). By qualitative assessment, the entorhinal cortex of 6 month-old PS1xAPP mice contained less number of NPY-positive somata (Fig. 1A, a6) than WT animals (see Fig. 1A, a5). Moreover, these PS1xAPP mice showed numerous dystrophic NPY-positive neurites, most of them associated to amyloid deposits (Fig. 1A, a6 and a8). In agreement with this, double SOM/NPY immunofluorescence labeling showed that the subpopulation of SOM cells that coexpresses NPY was highly affected in the PS1xAPP mice (not shown).

Stereological analysis (Fig. 1C) demonstrated a significant reduction in the density (neurons/mm³) of NPY-positive cells ($46.36 \pm 14.17\%$, $n = 6$; Tukey $p < 0.05$) in PS1xAPP mice at early ages, similar to the reduction observed for SOM cells.

On the other hand, we did not find differences in the numerical density (neurons/mm³) of PV-positive cells in PS1xAPP mice (Fig. 1D) or in the expression of PV mRNA by RT-PCR (not shown). All together, these findings indicated that, in this AD model, the SOM and NPY-positive entorhinal interneurons, but not PV-cells, displayed an early vulnerability, as also observed in the hippocampal formation [10].

The number of principal cells was selectively decreased in the deep entorhinal layers of PS1xAPP mice at 6 months of age

We next examined whether the principal cell density was also affected at early ages in this PS1xAPP model. To specifically distinguish interneurons from principal cells, we have performed a multiple immunolabeling approach. The different molecular profiles of cortical interneurons can be defined by the combination of the interneuronal markers SOM, PV, CR, and VIP [26]. Thus, to identify principal cells, we have first performed a multiple immunohistochemical labeling for bright field microscopy combining anti-SOM, anti-PV, anti-CR, and anti-VIP antibodies (cytoplasm of all cortical interneuronal populations were labeled in dark blue color by using DAB-nickel as chromogen). This was followed by anti-NeuN to label all neuronal cells (nuclei appeared in light brown color by using only DAB as chromogen). With this experimental approach, 5x multiple immunohistochemical labeling, principal

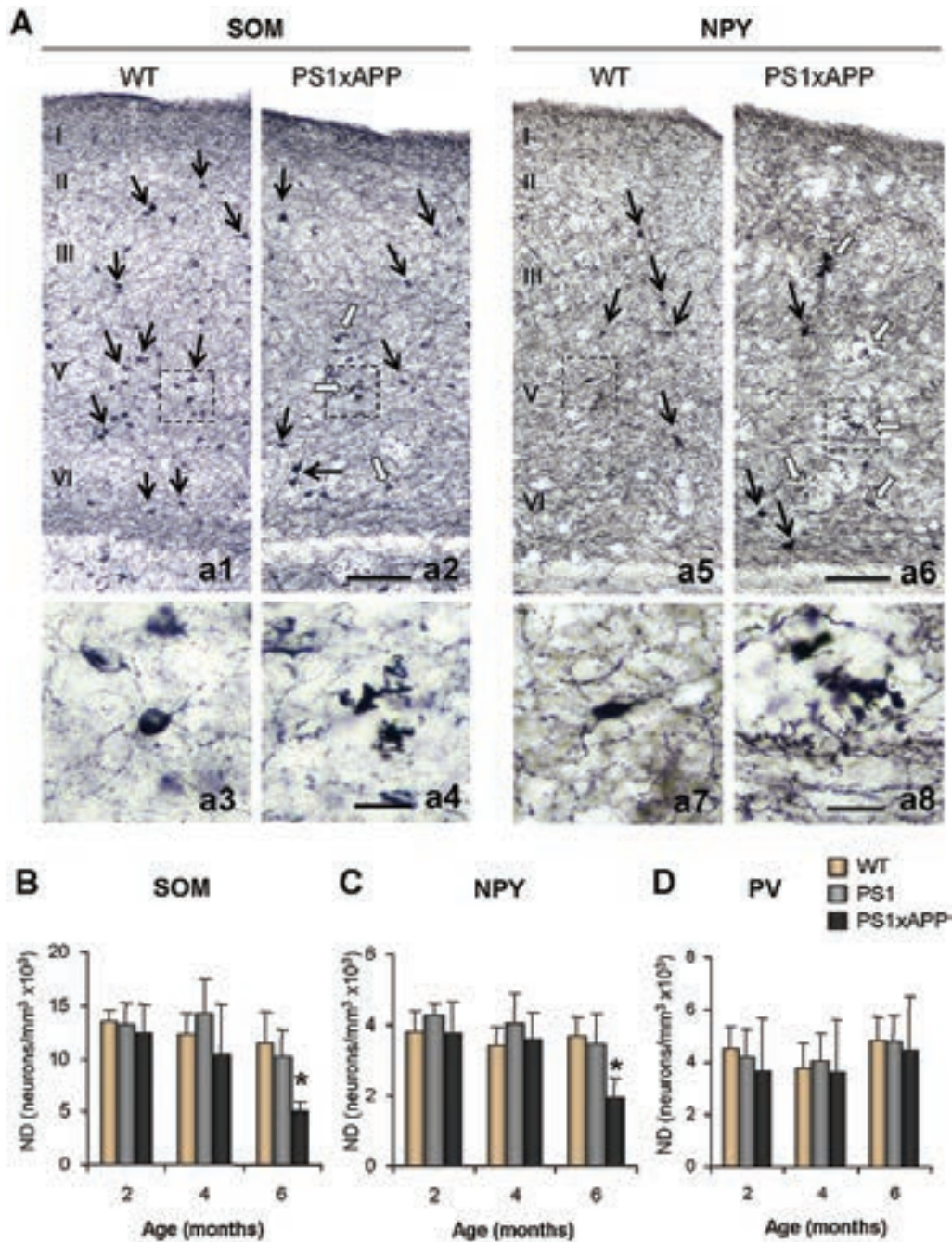


Fig. 1. Selective loss of SOM and NPY cells in the entorhinal cortex of PS1xAPP mice at 6 months of age. **A)** Light microscopic images of SOM (a1-a4) and NPY (a5-a8) immunostaining in entorhinal sections of 6 month-old WT (a1 and a3 for SOM; a5 and a7 for NPY) and PS1xAPP (a2 and a4 for SOM; a6 and a8 for NPY) mice. The number of SOM and NPY somata (black arrows) was clearly reduced in PS1xAPP mice compared to age-matched WT. Abundant immunoreactive dystrophic neurites (white arrows) were seen in the double Tg mice. **B-D)** Stereological quantification of SOM (B), NPY (C), and PV (D) positive cells in the entorhinal cortex of PS1xAPP, PS1, and WT mice at 2, 4, and 6 months of age. There was a significant decrease in the SOM and NPY neuronal densities (cells/mm³) of PS1xAPP Tg mice at 6 months of age. Data (mean \pm SD) were analyzed by one-way ANOVA (SOM $F(8,28) = 4.95$, $p < 0.001$; NPY $F(8,26) = 3.65$, $p = 0.006$) followed by Tukey post-hoc multiple comparison test. *Significance ($p < 0.01$) was indicated in the figure. No significant differences for PV-positive cell density were detected. $n = 6$ /age/group. Scale bars: a1, a2, a5 and a6, 100 μ m; a3, a4, a7 and a8, 20 μ m.

cells appeared as single NeuN-labeled whereas all interneurons displayed double labeling. We choose this approach to label all interneurons instead using classical GABA or GAD immunostaining because we have observed that the number of somata immunopositive for these markers (GABA and/or GAD) was always lower than for SOM or PV. This discrepancy could be due to tissue antigen preservation, antibody penetration, intracellular location (cell body/axonal boutons), or simply that GABAergic neurons are not uniform with respect to level of GABA or GAD content to be detected by immunohistochemistry. Anyway, the appropriate controls were performed to ensure methodological accuracy of the 5x multiple immunolabeling (see material and methods section). The single NeuN labeled neurons were then counted using unbiased stereological method in layers I-III (supragranular or superficial layers) and IV-VI (infragranular or deep layers) of the entorhinal cortex at 2- (before A β deposition) and 6- (moderate A β deposition and significant loss of SOM/NPY cells) months of age.

As shown in Fig. 2A (a1 and a2), at 2 months of age, the 5x immunolabeled sections displayed no qualitative differences between WT and PS1xAPP animals. However, at 6 months of age (Fig. 2C, c1 and c2), a marked decrease in the density of NeuN-labeled cells was clearly detected in PS1xAPP mice, as compared to WT littermates. This decrease was more obvious in the deep layers (Fig. 2C, c3 and c4). Quantitative stereological study revealed, as expected, the absence of differences in principal cell counts (neurons/mm³) between PS1xAPP and non-Tg mice at 2 months of age (Fig. 2B). However, in 6-month-old Tg mice a significant principal cell loss (compared to non-Tg littermates) was detected (Fig. 2D). The cell loss ($27.26 \pm 8.24\%$, $n = 6$, 7–8 sections per animal, two tailed t-test, $p < 0.001$) was concentrated, as predicted, in the infragranular layers whereas no significant differences were detected in supragranular layers. Though we have not analyzed layers V and VI separately, the degree of neuronal change seemed to be substantially larger in layer V than in layer VI. The early prominent principal neuronal loss in deep entorhinal layers highlights the selective vulnerability of these laminae in our model. This neuronal loss was not accompanied by a reduction of the entorhinal cortex volume (10.50 ± 0.84 , 9.98 ± 0.93 or 9.93 ± 1.52 mm³, $n = 6$, for WT, PS1, and PS1xAPP respectively).

Taken together, these data demonstrated the existence of an early neurodegenerative process in the entorhinal cortex of this PS1xAPP model. This pro-

cess specifically affected to SOM- and/or NPY-positive GABAergic cells and deep principal neurons. Most importantly, principal cell degeneration began early (6 months) in the entorhinal cortex and then proceeded later (18 months) in the hippocampus [10].

Entorhinal neurodegeneration in deep layers is associated with extracellular, rather than intracellular, A β accumulation

Based on the intracellular toxic effect of A β accumulation (see [27–30]), the preferential diminution of the principal cell density in deep layers could be due to a preferential accumulation of these peptides in this particular brain region. Thus, we first investigated the A β plaque distribution using Thioflavin-S. As shown qualitatively in Fig. 3A, and quantitatively in Fig. 3B, the A β plaques were first detected in 4-month-old PS1xAPP mice. Furthermore, substantially more amyloid plaques were observed in the entorhinal cortex and hippocampus than in other brain areas (not shown), which reflects the early vulnerability of these two forebrain regions in this AD model as reported in humans [8,31,32].

To elucidate more fully the preferential spatial location of amyloid deposition, the area occupied by Thioflavin-S positive compact deposits were quantified in deep (IV-VI) and superficial (I-III) layers at 4 and 6 months of age. As shown, Fig. 3B, at 4 months of age, entorhinal amyloid load was $0.2 \pm 0.15\%$ in superficial layers and $0.6 \pm 0.24\%$ for deep layers. At 6 months, A β deposition rapidly increased reaching $0.9 \pm 0.65\%$ and $3.9 \pm 1.14\%$ loads in superficial and deep layers, respectively. Thus, A β load in deep layers was significantly greater (3 times at 4 months and 4.3 times at 6 months, two tailed t-test $p < 0.001$, $n = 4$) than in superficial layers. Interestingly, the plaque formation in the deep layers was markedly accelerated during this two months period (amyloid burden was 6.5 times greater at 6 months than at 4 months, two tailed t-test $p < 0.001$, $n = 4$). The age-dependent increase in the total amyloid load in the deep layers appeared to be associated with both the number and the size of the plaques. To further support this observation, we have determined the number of plaques/mm² in the deep layers at 4 and 6 months of age. Plaques were dissected into four surface categories ranging from $< 200 \mu\text{m}^2$ to $> 2000 \mu\text{m}^2$ (Fig. 3C). As expected, there was a significant increase (2.5 times, $n = 5$, two tailed t-test $p < 0.05$) in the number of plaques/mm² at the age of 6 months (172.75 ± 53.80 at 6 months versus 67.41

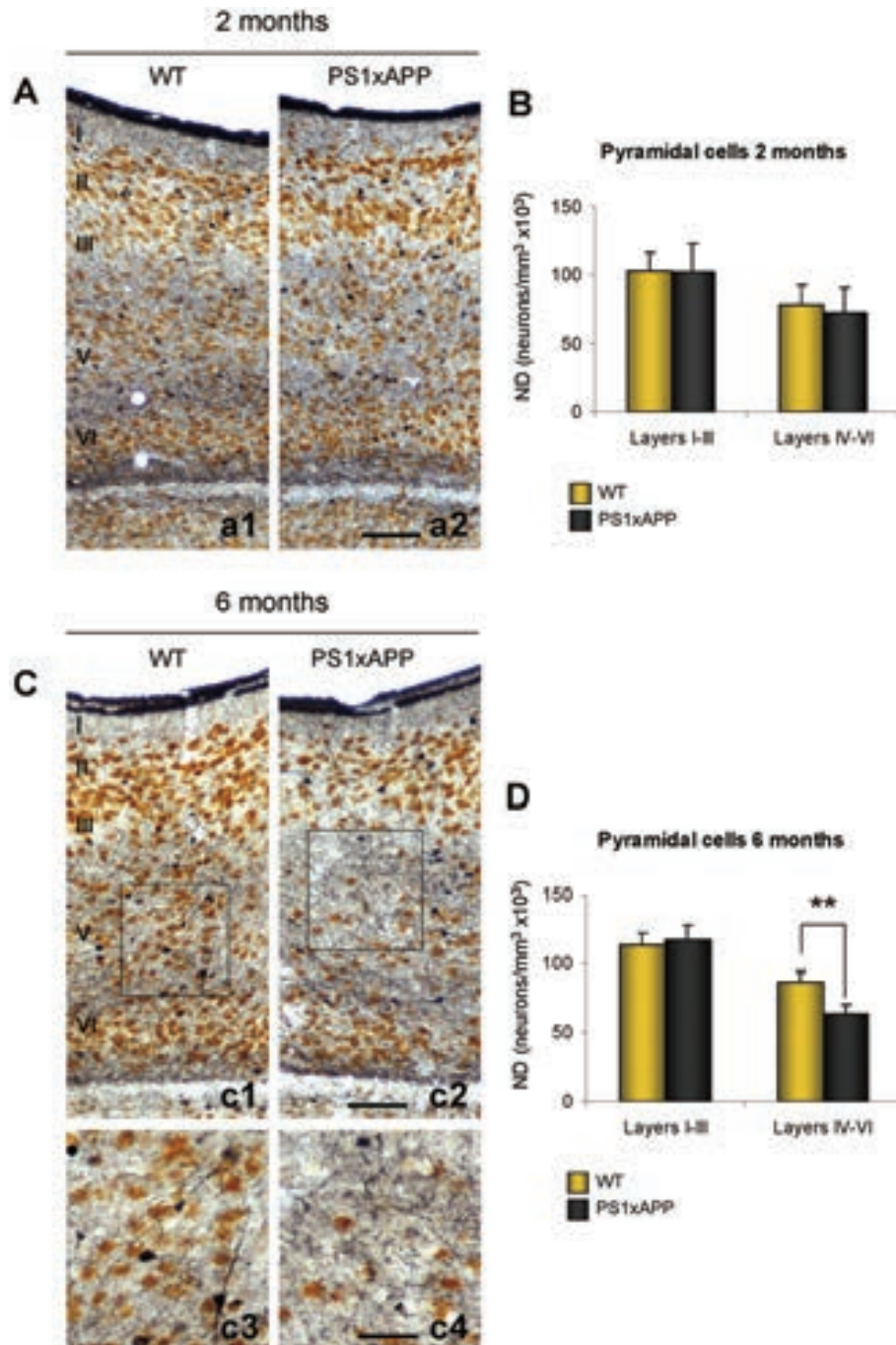


Fig. 2. Selective loss of principal cells in the deep layers of PS1xAPP entorhinal cortex at 6 months of age. Multiple 5x (SOM, PV, CR, VIP, and NeuN)-immunolabeling in the entorhinal cortex of WT and PS1xAPP mice at 2 (A) and 6 months (C) of age. Principal cells (single labeled NeuN cells in brown) were immunohistochemically differentiated from interneurons (SOM/PV/CR/VIP-labeled cells in dark blue). A noticeable decline of principal cells was found in PS1xAPP deep entorhinal layers at 6 months of age (c2) compared to age-matched controls (c1); see also higher magnification of layer V from 6 month-old PS1xAPP (c4) and WT (c3). No differences were found at 2 months of age (a2 vs a1). B and D, Stereological counts of principal cells in superficial (I-III) and deep (IV-VI) entorhinal layers from WT and PS1xAPP mice at 2 (B) and 6 (D) months of age. Data (mean \pm SD) revealed a significant decrease of principal cell density (neurons/mm³) in 6 month-old PS1xAPP deep layers ($n = 6, 7-8$ sections per mouse, two tailed t-test, $**p < 0.001$). No significant changes were detected in superficial layers. Scale bars: a1, a2, c1 and c2, 100 μ m; c3 and c4, 50 μ m.

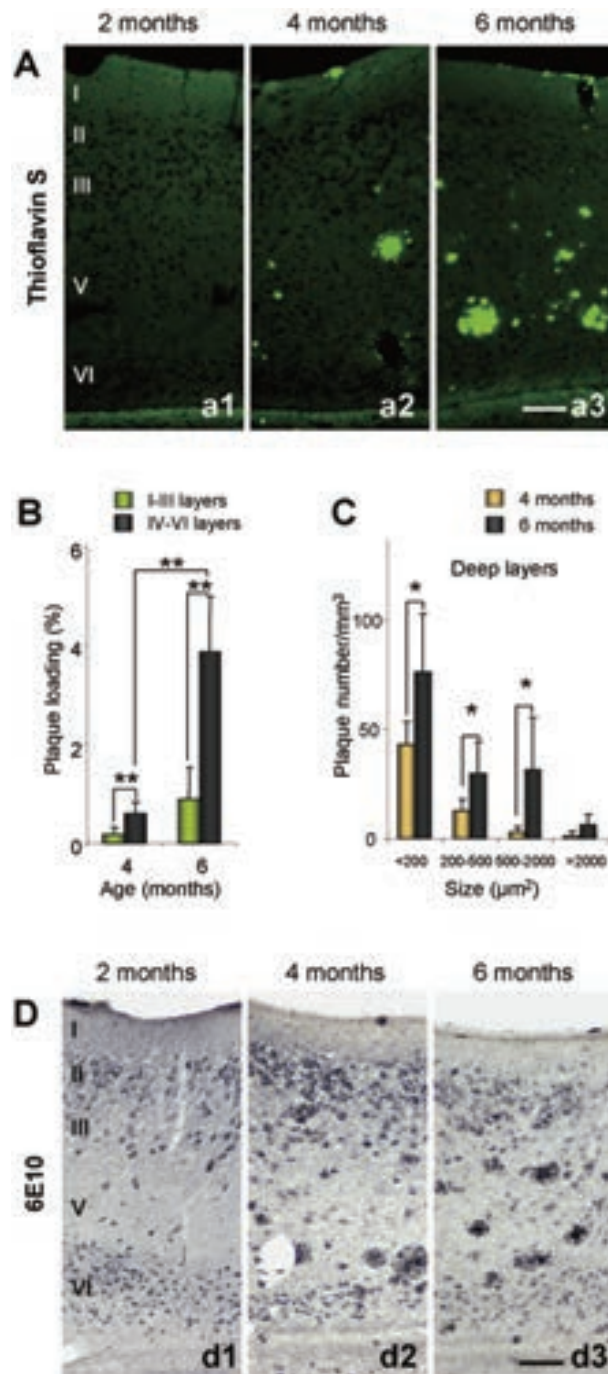


Fig. 3. Extracellular $A\beta$ deposits are preferentially located in deep layers of entorhinal cortex in PS1xAPP mice at early ages. **A)** Thioflavin-S staining in entorhinal cortex of PS1xAPP at 2 (a1), 4 (a2) and 6 (a3) months of age. Amyloid deposits were first seen at 4 months of age. No intracellular Thioflavin staining was detected at these ages. **B)** Entorhinal $A\beta$ load was significantly higher in deep layers than in superficial layers (two tailed t-test $**p < 0.001$, $n = 4$) at 4 and 6 months of age. **C)** The number and the size of the plaques in deep layers exhibited a considerable and significant increase from 4 to 6 months of age (two tailed t-test $*p < 0.05$, $n = 4$). **D)** 6E10 immunostaining in the entorhinal cortex of PS1xAPP mice at 2 (d1), 4 (d2), and 6 (d3) months of age. Amyloid deposits were detected at 4 months and then increased at 6 months of age. Intracellular 6E10 immunostaining was seen since 2 months of age in layers II, III, and VI, whereas most neurons in layer V were immunonegative. Scale bars: a1-a3 and b1-b3, 100 μm .

± 21.32 at 4 months). The number of plaques falling into the range of 200, 200–500, and 500–2000 μm^2 increased (1.8, 2.3, and 11.3 times, respectively; $n = 5$, two tailed t-test $p < 0.05$) at 6 months of age compared to 4 months. Interestingly, the plaques within the range of 500–2000 μm^2 displayed the highest increase.

These data were compatible with the existence of a preferential A β production in these entorhinal deep layers, as compared with superficial layers or other brain regions. Thus, we next investigated the expression of A β PP and its metabolites using the mAb 6E10. Immunostaining with 6E10 (Fig. 3D) revealed an extracellular A β accumulation similar to that observed using Thioflavin-S. On the other hand, intracellular 6E10 immunostaining was detectable beginning at 2 months of age in numerous entorhinal neurons located in layers II, III, and VI. Surprisingly, few scattered neurons in layer V displayed immunoreactivity for this antibody (see Fig. 3D, d1-3).

Because of 6E10 immunolabeled A β peptides as well as A β PP full length and C99 fragments, these data could indicate that layer V neurons did not express A β PP. Thus, the presence or absence of intracellular A β PP in this particular entorhinal layer was further investigated using an anti-hA β PP C-terminal antibody. For these experiments, we used 2-month-old PS1xAPP Tg mice, an age well before the neuronal loss. In fact, double hA β PP/6E10 immunofluorescent labeling revealed an overlapping of both markers within same neuronal somata (Fig. 4A, a1–a4). However, the double-immunostained neurons were predominantly located in superficial layers and in layer VI, whereas layer V was practically negative for both antibodies.

In order to confirm these findings, we have also used specific anti-A β_{1-40} and anti-A β_{1-42} antibodies in sections pre-treated with formic acid. As shown in Fig. 4B for A β_{42} no intraneuronal A β immunostaining was seen in the entorhinal cortex at early ages (2 and 4 months are shown in b1 and b2, respectively). As in other cortical layers, neurons in layer V were devoid of intracellular A β_{42} immunostaining (Fig. 4B, b4 and b5). However, other forebrain areas of same animals, such as motor cortex layer V neurons (Fig. 4B, b3 and b6) and subiculum (not shown), displayed marked intracellular A β_{42} labeling as early as 2 months of age. Therefore, our experimental approach (formic acid retrieval and anti-A β_{42} C-terminal specific antibody) was able to detect the intracellular A β . Interestingly, we have not found significant changes in the numerical density of layer V motor cortex neurons in 6 month-old PS1xAPP mice ($167.92 \pm 27.44 \times 10^3$ versus 188.02

$\pm 60.36 \times 10^3$ neurons/ mm^3 for WT and PS1xAPP respectively; $n = 5$).

Taken together, these data indicated that although a preferential accumulation of extracellular A β peptides seemed to occur in layer V and VI, the layer V principal cells did not express A β PP and, in consequence, could not accumulate intracellular A β peptides. Therefore, it is very unlikely that the layer V cell loss was induced by intracellular A β accumulation.

Early cytotoxic glial inflammatory response in the entorhinal cortex of PS1xAPP mice

The A β deposition was associated with a progressive activation of astro- and microglial cells [14,33]. However, the microglial activation could exhibit different phenotypes, such as alternative or classic, with different consequences in the neuronal survival. In this sense, the alternative phenotype could exert a neuroprotective role (by releasing IGF-1 or phagocytosing A β peptides) whereas the classic phenotype produced and released potentially cytotoxic factors (such as TNF α , TRAIL, FasL, NO) (see [14]). Thus, we have next characterized the inflammatory response in the entorhinal cortex of young (4–6 months old) WT, PS1, and PS1xAPP mice.

First, we have quantitatively determined the mRNA expression of key factors of the neuroinflammatory response, using qPCR in microdissected entorhinal cortex from 4 and 6 months of age (Fig. 5). As expected (Fig. 5A), there was a significant upregulation of the microglial marker CD11b (3.46 ± 0.62 , $n = 4$; Tukey $p < 0.001$) and astroglial marker GFAP (12.24 ± 0.86 , $n = 4$; Tukey $p < 0.001$) in 6 month-old PS1xAPP animals. The increase in GFAP mRNA in PS1xAPP Tg mice was also significant at 4 months of age (2.22 ± 0.67 , $n = 4$; Tukey $p = 0.016$). Level of CD11b mRNA was also slightly elevated in 4 months Tg entorhinal cortex, although not reaching statistical significance. This early increase of CD11b and GFAP mRNAs correlated with the initial appearance of A β plaques.

We next analyzed the expression of several classic cytotoxic factors by qPCR. As shown (Fig. 5B), mRNA levels of TNF α (2.60 ± 0.97 , $n = 4$; Tukey $p < 0.05$) and TRAIL (2.48 ± 0.66 , $n = 4$; Tukey, $p < 0.05$) were significant upregulated in PS1xAPP mice since 4 months of age. The expression of TNF α (4.77 ± 2.62 , $n = 4$; Tukey $p < 0.05$) further increased at 6 months of age and was accompanied by a concomitant significant increase in the death receptor TNFR1 mRNA (2.43 ± 0.68 , $n = 4$; Tukey $p < 0.05$). A high increase in Fas

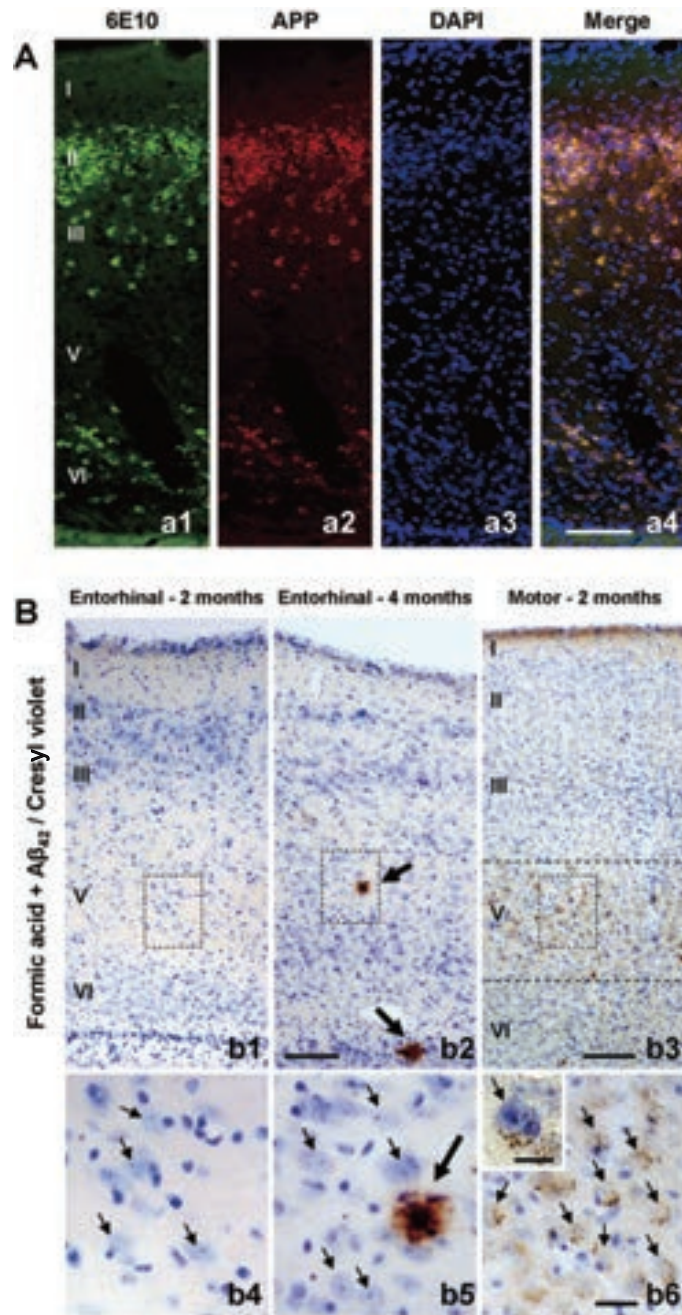


Fig. 4. Entorhinal neurons of PS1xAPP mice do not accumulate intracellular $A\beta$ at early ages. **A**) Double 6E10(a1)/hA β PP(a2) immunofluorescence labeling, together with nuclear DAPI (a3) counterstaining, in 2 month-old PS1xAPP entorhinal cortex. Merged image (a4) shows coincidence of 6E10 and A β PP immunostaining in same neuronal somata. None or very few neuronal bodies in layer V displayed immunoreactivity for these antibodies. Sections were examined under an epifluorescent Olympus BX-61 microscope. **B**) Sections from entorhinal (b1, b2, b4, and b5) and motor (b3 and b6) cortex of 2 (b1, b3, b4, and b6) and 4 (b2 and b5) month-old PS1xAPP mice immunolabeled with A β_{1-42} antibody (after formic acid pre-treatment) and counterstained with cresyl violet. A β_{1-42} immunoreactivity was only found in amyloid plaques at 4 months of age (big arrows) and no intraneuronally, however neurons of layer V in motor cortex of same mice at 2 months of age displayed robust intracellular A β immunostaining. Small arrows in b4 and b5 point layer V entorhinal neurons devoid of intraneuronal A β , whereas in b6 arrows point layer V motor neurons with intracellular punctuate immunolabeling. Inset shows higher magnification of a layer V motor neuron that accumulates A β_{1-42} . Scale bars: a1-a4 and b1-b3, 100 μ m; b4-b6, 20 μ m; inset in b6, 10 μ m.

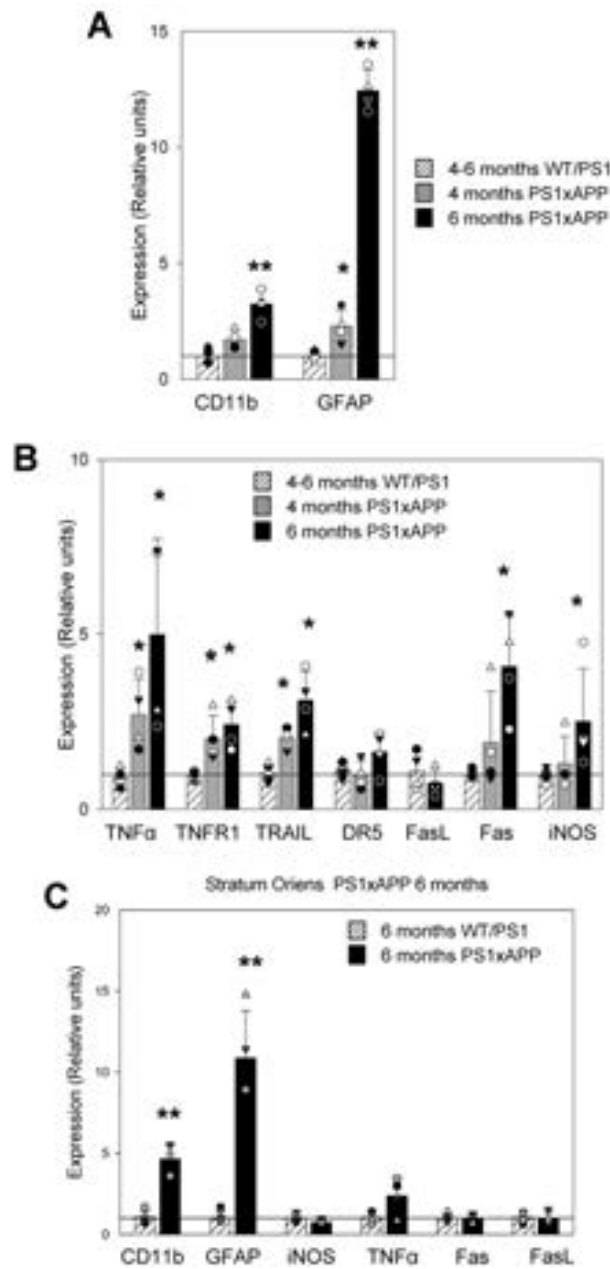
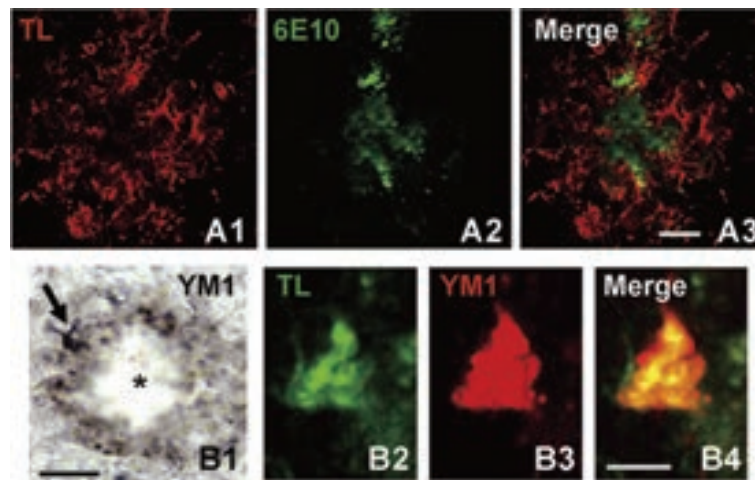


Fig. 5. Early glial activation displays a cytotoxic profile in the entorhinal cortex and a non-cytotoxic profile in the hippocampal stratum oriens of PS1xAPP mice. The mRNA expression of several inflammatory markers was determined by qPCR in microdissected samples of entorhinal cortex (A and B) and hippocampal stratum oriens (C) from 4 ($n = 4$) and 6 ($n = 4$) month-old PS1xAPP mice. **A**) Significant increase of CD11b (microglia) and GFAP (astrocytes) mRNAs was detected at 6 months of age. GFAP mRNA was also significantly upregulated at 4 month of age. **B**) A significant increase of iNOS, TNF α , TNFR1, TRAIL, and FasL was determined at 6 months of age. The expression of TNFR1 and TRAIL was also upregulated at 4 months of age. No changes were detected for FasL at 6 months. Data (mean \pm SD) were analyzed by one-way ANOVA (GFAP $F(2,12) = 577,92$, $p < 0.001$; CD11b $F(2,12) = 61,62$, $p < 0.001$; TNF α $F(2,10) = 7,35$, $p = 0.01$; TNFR1 $F(2,12) = 11,75$, $p = 0.001$; TRAIL $F(2,9) = 15,81$, $p = 0.001$; Fas $F(2,12) = 11,58$, $p = 0.002$; iNOS $F(2,11) = 4,17$, $p = 0.04$) followed by Tukey post-hoc multiple comparison test. Significance (** $p < 0.001$; * $p < 0.05$) was indicated in the figure. **C**) Significant increase in the mRNA expression of CD11b and GFAP was detected in the stratum oriens of PS1xAPP mice at 6 months of age. However, in this region there were no significant changes in the mRNA expression of iNOS, TNF α , Fas and FasL. Data (mean \pm SD) are expressed in reference to 6 months-old WT mice. Significant difference from age matched WT mice; two tailed t-test, ** $p < 0.001$.



Supplemental Fig. 1 Activated microglial cells are closely associated to amyloid plaques and display an alternative phenotype. Tomato lectin (TL)/6E10 (A1-A3) double fluorescence labeling in 6 month-old PS1xAPP entorhinal cortex. Activated microglial cells (tomato lectin-positive) were mainly found surrounding and infiltrating A β plaques (6E10 immunopositive). B1, Punctate immunostaining for the microglial alternative activation marker YM1 was found around plaques (asterisk). Some cellular bodies could be also identified (arrow). YM1/Tomato lectin double labelling (B2-B4) showed the presence of this marker in microglial cells. Confocal microscopy. Scale bars: A1-A3, 20 μ m; B1, 25 μ m; B2-B4, 5 μ m.

mRNA was detected as 6 months of age (3.99 ± 1.37 , $n = 4$; Tukey $p < 0.05$), whereas no changes were detected for FasL. In addition, the inducible form of NOS (iNOS) was also significantly increased (2.11 ± 1.26 , $n = 4$; Tukey $p < 0.05$) at 6 months of age. An upregulation of DR5 and Cox2 mRNAs was detected though it was not statistical significant (not shown). These data were consistent with the existence of an early (4–6 months), potentially cytotoxic, classic microglial response in the entorhinal cortex of PS1xAPP mice. We have also observed a similar microglial response in the hippocampus of PS1xAPP Tg model [14]. However, this classic activation was delayed until relatively old ages (18 months). At 6 months of age, microglial activation in the hippocampus displayed an alternative phenotype, characterized by the absence of expression of cytotoxic factors. Thus, it seemed that the potential cytotoxic microglial response at the entorhinal cortex occurs very early in the life span of this model. In order to confirm this observation, we have directly compared the microglial response in hippocampal microdissected samples from the same 6 month-old animals. We have focused our experiments in the stratum oriens, because this hippocampal area displayed a high extracellular A β deposition [10]. As expected, the results (Fig. 5C) demonstrated the existence of a glial activation in PS1xAPP mice compared to age-matched WT animals, with a clear induction in the expression of CD11b (4.44 ± 0.79 , $n = 4$, two tailed t-test $p < 0.001$) and GFAP (10.53 ± 2.85 , $n = 4$, two tailed t-test

$p < 0.001$) mRNAs. However, and also consistent with our previous data, the expression of the classic toxic factors TNF α , iNOS, and FasL remained unaltered. In consequence, these results demonstrated the existence of an early (4–6 months) classic microglial activation restricted to, at least, the entorhinal cortex.

We then addressed the inflammatory response at the cellular level by immunohistochemistry. For this purpose, we have used anti-CD11b (Fig. 6A, a1 and a2) and anti-GFAP (Fig. 6B, b1 and b2) antibodies to identify activated microglial and astroglial cells respectively. Microscopic analysis demonstrated the presence of activated microglial cells surrounding A β plaques at 4 (not shown) and 6 months of age (Fig. 6A, a2). Most activated microglial cells were obviously found in deep layers where A β plaques concentrated. Morphologically, these activated glial cells displayed enlargement of the cell body and retraction and swelling of microglial processes (see inset of Fig. 6A, a2 and Fig. 6C, c7). Resting microglial showed small cell body and thin and highly ramified processes as seen in control mice (Fig. 6A, a1 and Fig. 6C, c8). GFAP immunostaining was also highly increased in PS1xAPP entorhinal cortex since early ages (Fig. 6B, b2) as compared to age-matched non-transgenic mice (Fig. 6B, b1). However, reactive astrocytes did not displayed a clear association with A β plaques, instead they were located along the cortical column (see inset Fig. 6B, b2). The close association of activated microglia and plaques in double Tg mice was confirmed by double

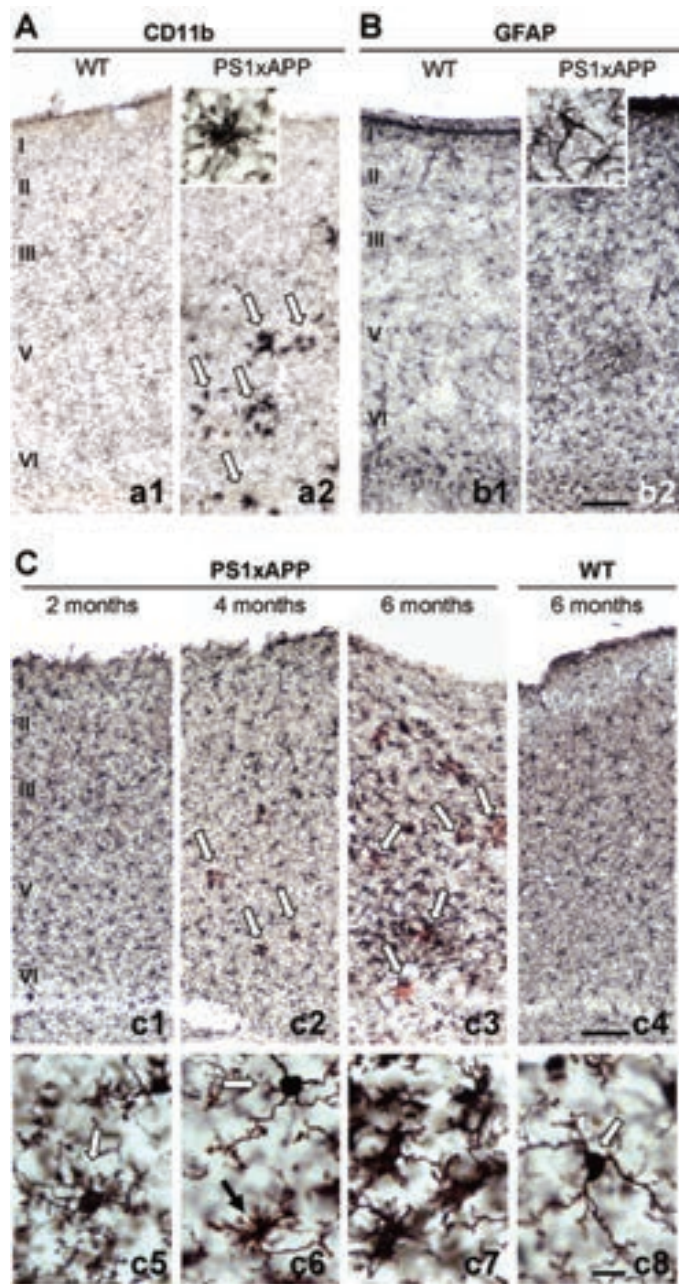


Fig. 6. Cellular expression of microglial (CD11b and Iba-1) and astroglial (GFAP) markers in the entorhinal cortex of young PS1xAPP mice. **A**) CD11b immunostaining shows resting microglial cells distributed throughout cortical laminae in WT mice (a1) and the presence of activated microglial cells, surrounding $A\beta$ plaques (arrows), mainly located in deep layers in PS1xAPP (a2) at 6 months of age. Activated microglia is morphologically characterized by hypertrophic cell body and numerous short and thick processes (see inset in a2). **B**) GFAP immunohistochemistry revealed a remarkable astrogliosis in the double Tg mice (b2) compared to control animals (b1). Higher magnification of a reactive astrocyte is shown in b2 inset. **C**) Iba-1 immunostaining highlighted microglial cell morphology allowing a clear identification of activated microglia in PS1xAPP mice. At 4 months of age, most activated microglia was closely associated to $A\beta$ plaque (c2, arrows) and very few could be seen in the inter-plaques regions (c6, white arrow point to a resident microglia while black arrow points to a slightly activated microglial cell). However at 6 months, besides $A\beta$ plaques surrounding microglia (arrows) numerous inter-plaques microglial cells were also activated (c3 and c7). No microglia activation was seen in 2-month-old PS1xAPP (c1; c5 shows a resident microglia) neither in 6-month-old WT mice (c4; c8 shows a resident microglial cell). Scale bars: a1, a2, b1 and b2, c1-c4, 100 μm ; Insets a2 and b2, 10 μm ; c5-c8, 10 μm .

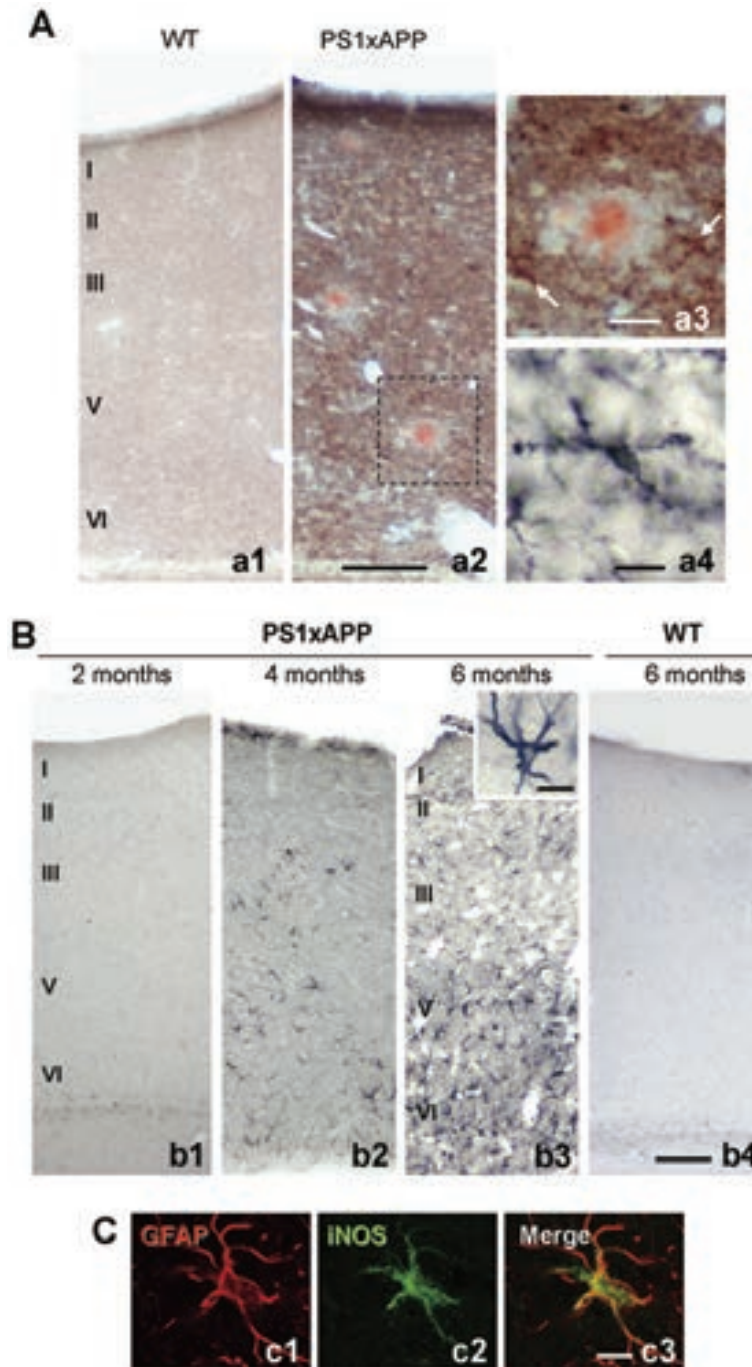


Fig. 7. Cellular immunolocalization of $\text{TNF}\alpha$ and iNOS in the entorhinal cortex of 6 month-old PS1xAPP mice. **A**) Strong $\text{TNF}\alpha$ immunoreactivity was observed widespread in all layers of the entorhinal cortex of PS1xAPP (a2) except in the periphery of Congo red stained $\text{A}\beta$ plaques (a3). $\text{TNF}\alpha$ -positive cells displayed clear microglial morphology (a4; and arrows in a3). No immunostaining for $\text{TNF}\alpha$ was detected in WT animal (a1). **B**) iNOS immunostaining was found in astroglial-like cells mainly in deep entorhinal layers at 4 months of age in PS1xAPP (b2) and then spread to other cortical layers at 6 months of age (b3). Inset in b3 shows a higher magnification image of an iNOS-positive cell. No immunostaining was found in 2 month-old PS1xAPP (b1). Control mice entorhinal cortex was immunonegative for iNOS as shown here at 6 months of age (b4). **C**) Double immunofluorescence labeling and confocal microscopy revealed that iNOS immunoreactivity was specifically localized in GFAP-positive astroglial cells. Scale bars: a1 and a2, 100 μm ; a3, 25 μm ; a4, 10 μm ; b1-b4, 100 μm ; inset in b3, 20 μm ; c1-c3, 10 μm .

fluorescent 6E10-Tomato lectin staining and confocal microscopy (supplemental Fig. 1, A1-A3). The microglial cells closely associated to plaques expressed YM-1 (supplemental Fig. 1, B1-B4), a marker of the non-proinflammatory alternative phenotype [34].

In the hippocampus of aged PS1xAPP mice inter-plaque microglial cells displayed an activated morphology and were YM-1 negative and TNF α positive [14]. Thus, we have next determined the morphological activation of inter-plaque microglial cells in the entorhinal cortex of young PS1xAPP mice. For these particular experiments, we used anti-Iba1 antibody (another microglial marker) that allowed a better discrimination of the microglial morphological phenotype (compare Fig. 6A and 6C). As shown (Fig. 6C, c1 and c5), in 2-month-old PS1xAPP mice, no microglial activation was observed (Fig. 6C, c4). In 4-month-old, most of the activated microglia was exclusively surrounded the A β plaques (stained with Congo red; Fig. 6C, c2). Most inter-plaque microglial cells appeared quiescent at this age (Fig. 6C, c6). However, in 6-month-old PS1xAPP mice, both the plaque-associated and inter-plaque microglial cells displayed a typical activated morphology (Fig. 6, c6). These data indicated that, similar to 18-month-old hippocampus, the inter-plaque microglial cells in the entorhinal cortex of young transgenic mice were activated. Furthermore, the activated inter-plaque microglial cells were preferentially, although not exclusively, located in the deep layers of the entorhinal cortex.

Finally, we have also determined the cellular expression of two key potentially cytotoxic factors, TNF α and iNOS, in the entorhinal cortex of PS1xAPP mice (Fig. 7). With respect to TNF α , results demonstrated an intense and diffuse (probably due to soluble TNF α) immunostaining along the cortical column in 6-month-old PS1xAPP animals (Fig. 7A, a2), whereas age-matched control mice showed no immunoreactivity for this antigen (Fig. 7A, a1). No neuronal profiles were positive for TNF α , instead immunoreactive cells with microglial morphology were observed (Fig. 7A, a3 and a4). Interestingly, the periphery of amyloid plaques, where numerous activated microglial cells were located, was immunonegative for this marker (Fig. 7A, a3). Thus, similar to that observed in hippocampus [14], microglial cells closely associated to deposits displayed a non-cytotoxic TNF-negative (and YM-1 positive) phenotype. However, the inter-plaque microglia adopted a pro-inflammatory cytotoxic TNF α positive (and YM1 negative) phenotype [14]. On the other hand, iNOS immunostaining was present in glial cells with astro-

cytic morphology since 4 months of age (Fig. 7B). At this early age these iNOS-positive cells were mainly located in the deep layers (Fig. 7B, b2) whereas, at 6 months, they were also observed in superficial layers (Fig. 7B, b3). Double GFAP-iNOS labeling and confocal microscopy demonstrated the astrocytic origin of all iNOS-positive cells (Fig. 7C c1–c3). At 2 months of age, no iNOS-positive cells were detected in PS1xAPP (Fig. 7B, b1). Control mice showed none or very few iNOS positive cells at these early ages (Fig. 7B, b4).

DISCUSSION

The present study demonstrated: 1) early (6 months) significant neurodegeneration of principal cells, as well as SOM- and NPY-interneurons, in the entorhinal cortex of PS1^{M146L}xAPP^{751SL} transgenic mice; 2) principal cell loss occurred in deep layers while SOM cells were vulnerable along the cortical column; 3) selective entorhinal neurodegeneration was not associated with intracellular accumulation of A β instead coincided, spatial and temporally, with extracellular amyloid load and gliosis; importantly, this early glial inflammatory response exhibited a cytotoxic profile; and 4) in the hippocampus, at the same age, extracellular A β induced a non-cytotoxic glial activation.

Though significant neuronal loss is a key feature in AD brains, most transgenic models for this pathology failed to undergo neurodegeneration, at least at early ages. We have previously demonstrated a significant (50–60%) early (6 months) loss of SOM/NPY interneurons in the hippocampus of this PS1xAPP model [10]. Here, we extend our previous finding and demonstrate that this dendritic inhibitory population was also preferentially affected (46–56%) in the entorhinal cortex. However, perisomatic PV interneurons were highly preserved [10]. These findings were strongly consistent with the prominent reduction of SOM and NPY neuropeptides in cortical postmortem tissue from AD patients [35–42], that has been attributed to degeneration of intrinsic neurons [24,43–47].

On the other hand, while hippocampal pyramidal loss (30% in CA1) takes place at advanced ages (>17 months) in this model [13,14], our present results demonstrated a patent entorhinal principal cell loss in deep layers (27%) as early as 6 months of age. To the best of our knowledge, this is the first report of such early and lamina selective neurodegeneration of entorhinal principal cells in an AD model. Our findings resemble the selective vulnerability of distinct types of principal

neurons reported in AD patients [2,8,9]. Therefore, this PS1xAPP mouse could mimic the initial stages of the pathology in humans [2,9,48], showing temporal- and regional age-dependent vulnerability, with early entorhinal principal cell loss previous to hippocampal deterioration.

The molecular mechanism(s) that underlies this early entorhinal neuronal loss remains to be elucidated, however, the A β peptides have been suggested as major contributors for neurodegeneration in AD (reviewed in [29,49]; see also [50]). In this sense, a correlation between intraneuronal A β and neuronal death/dysfunction has been described in several transgenic mice [27,30,51–53]. In our model, intracellular 6E10 immunostaining was found at very early ages (2 months), prior to the appearance of amyloid plaques [30,51,54,55]. However, besides an intense intracellular immunoreactivity, no changes in the numerical density of layers II and III principal neurons were observed. On contrary, in layer V where pyramidal loss was concentrated, few scattered neuronal somata displayed 6E10 immunostaining, even in 2-month-old Tg mice. Furthermore, few layer V neurons were also immunopositive for A β PP-C-terminal antibody at any age, indicating that most of the pyramidal neurons in this layer did not even express the transgenic hA β PP. The monoclonal 6E10 could also recognize A β PP products, including full-length A β PP. Therefore, it is possible that the observed somatic 6E10 immunostaining corresponded, in fact, to the precursor proteins rather than A β (see Fig. 4A). Supporting this, we have not found intraneuronal immunoreactivity using either A β _{1–40} or A β _{1–42} antibodies in any entorhinal layer (even using formic acid pre-treatment; see Fig. 4B). However, robust intracellular A β _{1–42} immunoreactivity was indeed observed in motor cortex layer V neurons and in subicular neurons from the same animals.

In sum, although we do not know the reasons that determine the absence of expression of transgenic hAPP in layer V from this particular brain area (Tg hAPPsl was clearly expressed by layer V principal cells in other cortical regions; not shown), it seems very unlikely that entorhinal neuronal death in our model resulted from intracellular A β pathology. In agreement with this idea, the selective loss of SOM/NPY cells was not either associated with intracellular amyloid accumulation since they do not express the mutated hA β PP [10]. A recent study [56] in another PS1xAPP model has also found loss of neurons (monoaminergic -MAergic- cells from raphe nuclei) that was not associated with accumulation of intracellular A β . In fact, the loss of these

neurons was preceded by MAergic axonal degeneration in forebrain areas that showed early A β deposits and glial (astroglial/microglial) reaction.

In the entorhinal cortex, also coincident with the amyloid plaque deposition, there was a marked glial activation. These activated microglial cells could exert a beneficial function, restricting plaque formation by phagocytosis, or promote disease by causing neuronal damage [10,14,57–59]. Moreover, microglia could display different phenotypes during disease progression (see Fig. 8). In fact, we have recently reported an age-dependent functional switch of microglial cells in the hippocampus of this model [14]. At early ages (6 months), hippocampal activated microglial cells were closely associated with amyloid deposits and displayed an alternative phenotype with neuroprotective features. On the other hand, at 18 months, hippocampal interplaque regions also showed activated microglia, though in this case with a classic cytotoxic phenotype (expressing TNF α and related factors). The interplaque activation temporally correlated with marked hippocampal pyramidal loss. Similarly, entorhinal A β plaque-associated microglia displayed an alternative phenotype (YM1 positive, TNF α negative). However, the inter-plaque microglia, at this early age, was already activated and displaying a classic, TNF α positive, phenotype. Also in consonance with our previous data, a significant upregulation of TNF α , TRAIL, and iNOS mRNAs were also observed at early ages. Furthermore, we have also observed a preferential expression of iNOS by reactive astrocytes located in deep entorhinal layers.

Based on these data, it is tempting to speculate that the early cytotoxic glial response (micro- and astroglial) observed in deep entorhinal layers might be implicated in the pyramidal cell loss at early ages. Thus, it is possible that this early inflammatory reaction might be also implicated in the degeneration of SOM cells in both deep and superficial layers. In fact, iNOS expression showed a clear temporal gradient from deep (at 4 months) to superficial layers (at 6 months), and TNF α immunostaining was spread along the whole cortical column, probably due to diffusion of the soluble pool.

It is noteworthy that, using microdissected samples of hippocampal stratum oriens of the same mice population, we have confirmed the existence of a non-cytotoxic glial response at these early ages in the hippocampus (Fig. 5C) [14]. Therefore, it is relevant to consider that, at 6 months of age, the A β -associated inflammatory response (see Fig. 8) could play different roles in entorhinal cortex (classic proinflammatory phe-

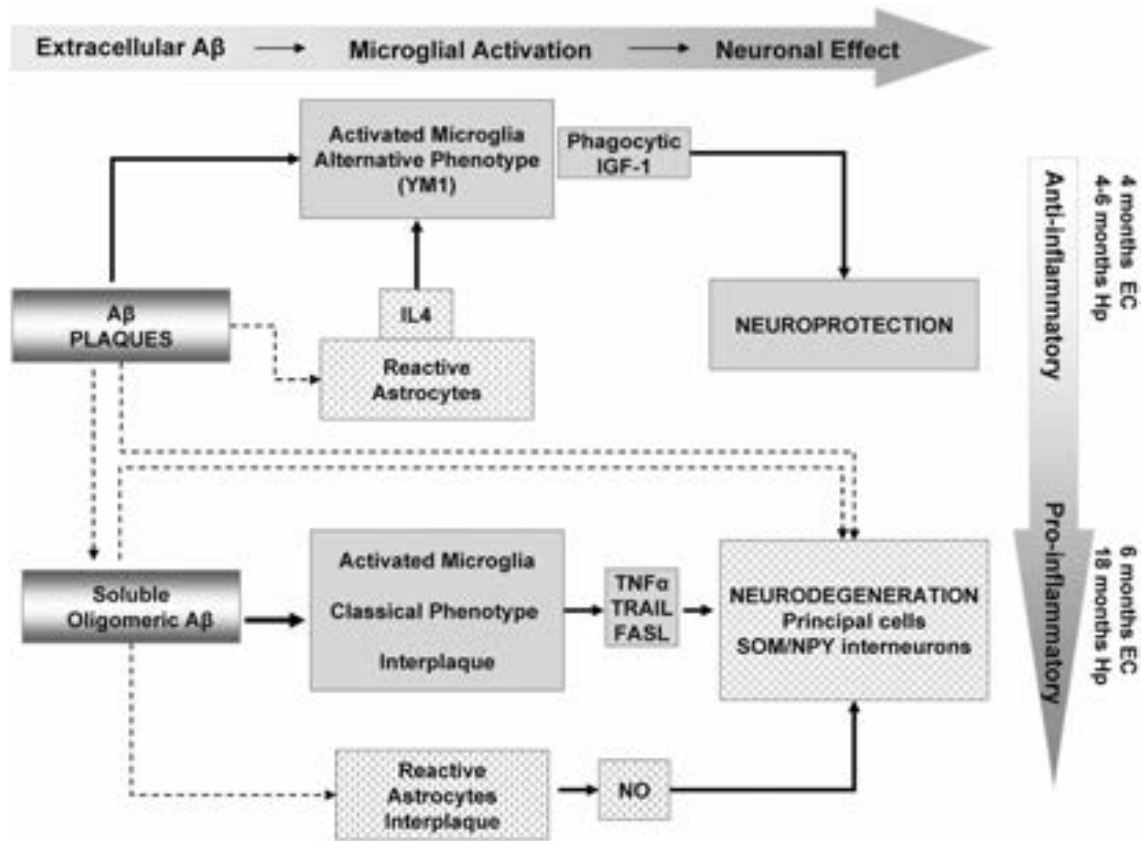


Fig. 8. Schematic representation of the microglial activation by $A\beta$ and its age-dependent neuroprotective or neurodegenerative effect in PS1xAPP entorhinal cortex and hippocampus. At 4 months of age in both regions, $A\beta$ deposits promote microglial activation to an alternative phenotype (YM1-positive) that shows phagocytic capability and expression of IGF1. At the same time, reactive astrocytes, recruited by $A\beta$, release IL-4 that induces differentiation of microglial cells to an alternative stage. This alternative microglia, only surround $A\beta$ plaques, might contribute to neuronal protection. However, at 6 months of age in the entorhinal cortex, and much later (18 months) in the hippocampus, extracellular $A\beta$ (plaques and/or oligomeric soluble forms) induce the activation of interplaque microglial cells to a classical phenotype and release of cytotoxic molecules (TNF α , TRAIL, FASL) that are harmful for neurons. Reactive astrocytes (non-associated to plaques) probably contribute to neurodegeneration by NO-mediated neurotoxicity. $A\beta$ plaques might be a source of soluble oligomeric $A\beta$. Dashed lines indicate proposed mechanisms. EC, entorhinal cortex; Hp, hippocampus. See also [14].

notype, probably involved in neurodegeneration) and hippocampus (alternative phenotype, probably neuroprotective). The existence of opposite inflammatory reactions in the most vulnerable brain regions to AD, at the same chronological age, might be involved in the controversial/disappointing results of non-steroidal anti-inflammatory drugs trials for protecting against the development of AD [60,61].

At present, we do not know the nature of the $A\beta$ species implicated in the microglial activation. However, soluble $A\beta$ oligomers are reported to be the preferential toxic amyloid species [62–64]. Amyloid plaques are potentially major sources of soluble and toxic oligomeric $A\beta$ [65]. Furthermore, we have recently reported microglial activation due to oligomeric $A\beta$ [14]. Thus, the preferential accumulation of $A\beta$

plaques in deep layers (this study), that agrees with the entorhinal connectivity and the synaptic release of $A\beta$, might also locally increase the concentration $A\beta$ oligomers. This could, in consequence, induce a neuroinflammatory process that might substantially contribute to neurodegeneration by releasing cytotoxic agents [66–74]. We cannot discard a direct effect of such $A\beta$ oligomers, affecting the most vulnerable neuronal populations.

In sum, neurodegeneration of principal neurons in the entorhinal cortex of the PS1xAPP model occurs earlier than in hippocampus, as also observed in AD brains. Furthermore, there is a profound early loss of SOM/NPY interneurons also resembling the neuropathology in humans. The ubiquitous loss of SOM cells seems to be correlated with the cytotoxic inflam-

matory reaction whereas the deep principal cells could be also affected by the preferential accumulation of extracellular $A\beta$. Therefore, simultaneously, during disease progression, the most vulnerable brain regions (entorhinal cortex and hippocampus) show different degree of pathology affectation and, more importantly, different inflammatory profiles. In addition, these findings open the question of whether different neuronal subtypes (even within a single brain region) could display different vulnerability to several toxic environments, caused by the accumulation of $A\beta$ species.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Spanish grants PI060556 (to AG), PI060567 (to JV), PI060781 (to DR) from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) -Instituto de Salud Carlos III-, and by Proyecto de Excelencia CVI-902 from Junta de Andalucía. IMG, DBV, and SJ were the recipients of a contract from CIBERNED. MT and RSV held PhD fellowships from Junta de Andalucía and MEC of Spain, respectively.

Authors' disclosures available online (<http://www.j-alz.com/disclosures/view.php?id=61>).

REFERENCES

- [1] Braak H, Braak E (1997) Diagnostic criteria for neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **18**, S85-S88.
- [2] Gomez-Isla T, Price JL, McKeel DW, Jr., Morris JC, Growdon JH, Hyman BT (1996) Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci* **16**, 4491-4500.
- [3] Canto CB, Wouterlood FG, Witter MP (2008) What does the anatomical organization of the entorhinal cortex tell us? *Neural Plast* **2008**, 381243.
- [4] Chrobak JJ, Amaral DG (2007) Entorhinal cortex of the monkey: VII. intrinsic connections. *J Comp Neurol* **500**, 612-633.
- [5] Insausti R, Amaral DG (2008) Entorhinal cortex of the monkey: IV. Topographical and laminar organization of cortical afferents. *J Comp Neurol* **509**, 608-641.
- [6] Toledo-Morrell L, Stoub TR, Bulgakova M, Wilson RS, Bennett DA, Leurgans S, Wu J, Turner DA (2004) MRI-derived entorhinal volume is a good predictor of conversion from MCI to AD. *Neurobiol Aging* **25**, 1197-1203.
- [7] Stoub TR, Toledo-Morrell L, Stebbins GT, Leurgans S, Bennett DA, Shah RC (2006) Hippocampal disconnection contributes to memory dysfunction in individuals at risk for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10041-10045.
- [8] Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* **82**, 239-259.
- [9] Price JL, Ko AI, Wade MJ, Tsou SK, McKeel DW, Morris JC (2001) Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer disease. *Arch Neurol* **58**, 1395-1402.
- [10] Ramos B, Baglietto-Vargas D, Del Rio JC, Moreno-Gonzalez I, Santa-Maria C, Jimenez S, Caballero C, Lopez-Tellez JF, Khan ZU, Ruano D, Gutierrez A, Vitorica J (2006) Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1xAPP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **27**, 1658-1672.
- [11] Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, Planche M, Canton T, Jedidi I, Gohin M, Wirths O, Bayer TA, Langui D, Duyckaerts C, Tremp G, Pradier L (2003) Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with Abeta deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp Neurol* **184**, 247-263.
- [12] Caballero C, Jimenez S, Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Gavilan MP, Ramos B, Del Rio JC, Vizuete M, Gutierrez A, Ruano D, Vitorica J (2007) Inter-individual variability in the expression of the mutated form of hPS1M146L determined the production of Abeta peptides in the PS1xAPP transgenic mice. *J Neurosci Res* **85**, 787-797.
- [13] Schmitz C, Rutten BP, Pielen A, Schafer S, Wirths O, Tremp G, Czech C, Blanchard V, Multhaup G, Rezaie P, Korr H, Steinbusch HW, Pradier L, Bayer TA (2004) Hippocampal neuron loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **164**, 1495-1502.
- [14] Jimenez S, Baglietto-Vargas D, Caballero C, Moreno-Gonzalez I, Torres M, Sanchez-Varo R, Ruano D, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J (2008) Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *J Neurosci* **28**, 11650-11661.
- [15] Colton CA, Mott RT, Sharpe H, Xu Q, Van Nostrand WE, Vitek MP (2006) Expression profiles for macrophage alternative activation genes in AD and in mouse models of AD. *J Neuroinflammation* **3**, 27.
- [16] van GT (2001) Entorhinal cortex of the mouse: cytoarchitectonical organization. *Hippocampus* **11**, 397-407.
- [17] Insausti R, Herrero MT, Witter MP (1997) Entorhinal cortex of the rat: cytoarchitectonic subdivisions and the origin and distribution of cortical efferents. *Hippocampus* **7**, 146-183.
- [18] Franklin K.B.J.:Paxinos G (2008) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, Academic Press.
- [19] Ruano D, Lambalez B, Rossier J, Paternain AV, Lerma J (1995) Kainate receptor subunits expressed in single cultured hippocampal neurons: molecular and functional variants by RNA editing. *Neuron* **14**, 1009-1017.
- [20] Gundersen HJ, Jensen EB, Kieu K, Nielsen J (1999) The efficiency of systematic sampling in stereology—reconsidered. *J Microsc* **193**, 199-211.
- [21] Vincent SR, Johansson O, Hokfelt T, Meyerson B, Sachs C, Elde RP, Terenius L, Kimmel J (1982) Neuropeptide coexistence in human cortical neurones. *Nature* **298**, 65-67.
- [22] Hendry SH, Jones EG, Emson PC (1984) Morphology, distribution, and synaptic relations of somatostatin- and neuropeptide Y-immunoreactive neurons in rat and monkey neocortex. *J Neurosci* **4**, 2497-2517.
- [23] Chronwall BM, Chase TN, O'Donohue TL (1984) Coexistence of neuropeptide Y and somatostatin in rat and human cortical and rat hypothalamic neurons. *Neurosci Lett* **52**, 213-217.
- [24] Chan-Palay V (1987) Somatostatin immunoreactive neurons in the human hippocampus and cortex shown by immunogold/silver intensification on vibratome sections: coexistence with neuropeptide Y neurons, and effects in Alzheimer-type dementia. *J Comp Neurol* **260**, 201-223.

- [25] Papadopoulos GC, Parnavelas JG, Cavanagh ME (1987) Extensive co-existence of neuropeptides in the rat visual cortex. *Brain Res* **420**, 95-99.
- [26] Miyoshi G, Butt SJ, Takebayashi H, Fishell G (2007) Physiologically distinct temporal cohorts of cortical interneurons arise from telencephalic Olig2-expressing precursors. *J Neurosci* **27**, 7786-7798.
- [27] Casas C, Sergeant N, Itier JM, Blanchard V, Wirths O, van der KN, Vingdeux V, van de SE, Ret G, Canton T, Drobecq H, Clark A, Bonici B, Delacourte A, Benavides J, Schmitz C, Tremp G, Bayer TA, Benoit P, Pradier L (2004) Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *Am J Pathol* **165**, 1289-1300.
- [28] Christensen DZ, Kraus SL, Flohr A, Cotel MC, Wirths O, Bayer TA (2008) Transient intraneuronal Abeta rather than extracellular plaque pathology correlates with neuron loss in the frontal cortex of APP/PS1KI mice. *Acta Neuropathol* **116**, 647-655.
- [29] Laferla FM, Green KN, Oddo S (2007) Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* **8**, 499-509.
- [30] Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van EL, Berry R, Vassar R (2006) Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci* **26**, 10129-10140.
- [31] Thal DR, Rub U, Schultz C, Sassin I, Ghebremedhin E, Del TK, Braak E, Braak H (2000) Sequence of Abeta-protein deposition in the human medial temporal lobe. *J Neuropathol Exp Neurol* **59**, 733-748.
- [32] Thal DR, Rub U, Orantes M, Braak H (2002) Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* **58**, 1791-1800.
- [33] Bryan KJ, Zhu X, Harris PL, Perry G, Castellani RJ, Smith MA, Casadesus G (2008) Expression of CD74 is increased in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* **3**, 13.
- [34] Edwards MM, Robinson SR (2006) TNF alpha affects the expression of GFAP and S100B: implications for Alzheimer's disease. *J Neural Transm* **113**, 1709-1715.
- [35] Davies P, Katzman R, Terry RD (1980) Reduced somatostatin-like immunoreactivity in cerebral cortex from cases of Alzheimer disease and Alzheimer senile dementia. *Nature* **288**, 279-280.
- [36] Rossor MN, Emson PC, Mountjoy CQ, Roth M, Iversen LL (1980) Reduced amounts of immunoreactive somatostatin in the temporal cortex in senile dementia of Alzheimer type. *Neurosci Lett* **20**, 373-377.
- [37] Arai H, Moroji T, Kosaka K (1984) Somatostatin and vasoactive intestinal polypeptide in postmortem brains from patients with Alzheimer-type dementia. *Neurosci Lett* **52**, 73-78.
- [38] Beal MF, Mazurek MF, Svendsen CN, Bird ED, Martin JB (1986) Widespread reduction of somatostatin-like immunoreactivity in the cerebral cortex in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **20**, 489-495.
- [39] Beal MF, Mazurek MF, Chattha GK, Svendsen CN, Bird ED, Martin JB (1986) Neuropeptide Y immunoreactivity is reduced in cerebral cortex in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **20**, 282-288.
- [40] Reinikainen KJ, Riekkinen PJ, Jolkkonen J, Kosma VM, Soininen H (1987) Decreased somatostatin-like immunoreactivity in cerebral cortex and cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Brain Res* **402**, 103-108.
- [41] Grouselle D, Winsky-Sommerer R, David JP, Delacourte A, Dournaud P, Epelbaum J (1998) Loss of somatostatin-like immunoreactivity in the frontal cortex of Alzheimer patients carrying the apolipoprotein epsilon 4 allele. *Neurosci Lett* **255**, 21-24.
- [42] Davis KL, Mohs RC, Marin DB, Purohit DP, Perl DP, Lantz M, Austin G, Haroutunian V (1999) Neuropeptide abnormalities in patients with early Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* **56**, 981-987.
- [43] Morrison JH, Rogers J, Scherr S, Benoit R, Bloom FE (1985) Somatostatin immunoreactivity in neuritic plaques of Alzheimer's patients. *Nature* **314**, 90-92.
- [44] Beal MF, Benoit R, Mazurek MF, Bird ED, Martin JB (1986) Somatostatin-28(1-12)-like immunoreactivity is reduced in Alzheimer's disease cerebral cortex. *Brain Res* **368**, 380-383.
- [45] Nakamura S, Vincent SR (1986) Somatostatin- and neuropeptide Y-immunoreactive neurons in the neocortex in senile dementia of Alzheimer's type. *Brain Res* **370**, 11-20.
- [46] Gaspar P, Duyckaerts C, Febvret A, Benoit R, Beck B, Berger B (1989) Subpopulations of somatostatin 28-immunoreactive neurons display different vulnerability in senile dementia of the Alzheimer type. *Brain Res* **490**, 1-13.
- [47] Kumar U (2005) Expression of somatostatin receptor subtypes (SSTR1-5) in Alzheimer's disease brain: an immunohistochemical analysis. *Neuroscience* **134**, 525-538.
- [48] Kordower JH, Chu Y, Stebbins GT, DeKosky ST, Cochran EJ, Bennett D, Mufson EJ (2001) Loss and atrophy of layer II entorhinal cortex neurons in elderly people with mild cognitive impairment. *Ann Neurol* **49**, 202-213.
- [49] Li M, Chen L, Lee DH, Yu LC, Zhang Y (2007) The role of intracellular amyloid beta in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* **83**, 131-139.
- [50] Castellani RJ, Zhu X, Lee HG, Moreira PI, Perry G, Smith MA (2007) Neuropathology and treatment of Alzheimer disease: did we lose the forest for the trees? *Expert Rev Neurother* **7**, 473-485.
- [51] Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, Laferla FM (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* **39**, 409-421.
- [52] Billings LM, Oddo S, Green KN, McLaugh JL, Laferla FM (2005) Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* **45**, 675-688.
- [53] Bayer TA, Wirths O (2008) [Alzheimer's disease: Molecular pathology, animal models, and current treatment.]. *Nervenarzt* **79** (Suppl 3), 117-125.
- [54] Masliah E, Sisk A, Mallory M, Mucke L, Schenk D, Games D (1996) Comparison of neurodegenerative pathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein and Alzheimer's disease. *J Neurosci* **16**, 5795-5811.
- [55] Wirths O, Multhaup G, Czech C, Blanchard V, Moussaoui S, Tremp G, Pradier L, Beyreuther K, Bayer TA (2001) Intraneuronal Abeta accumulation precedes plaque formation in beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. *Neurosci Lett* **306**, 116-120.
- [56] Liu Y, Yoo MJ, Savonenko A, Stirling W, Price DL, Borchelt DR, Mamounas L, Lyons WE, Blue ME, Lee MK (2008) Amyloid pathology is associated with progressive monoaminergic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* **28**, 13805-13814.
- [57] El Khoury J, Luster AD (2008) Mechanisms of microglia accumulation in Alzheimer's disease: therapeutic implications.

- Trends Pharmacol Sci* **29**, 626-632.
- [58] Farfara D, Lifshitz V, Frenkel D (2008) Neuroprotective and neurotoxic properties of glial cells in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* **12**, 762-780.
- [59] Zhu X, Su B, Wang X, Smith MA, Perry G (2007) Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Mol Life Sci* **64**, 2202-2210.
- [60] McGeer PL, McGeer EG (2007) NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiol Aging* **28**, 639-647.
- [61] Aisen PS (2008) The inflammatory hypothesis of Alzheimer disease: dead or alive? *Alzheimer Dis Assoc Disord* **22**, 4-5.
- [62] Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, Wals P, Zhang C, Finch CE, Krafft GA, Klein WL (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6448-6453.
- [63] De Felice FG, Vieira MN, Saraiva LM, Figueroa-Villar JD, Garcia-Abreu J, Liu R, Chang L, Klein WL, Ferreira ST (2004) Targeting the neurotoxic species in Alzheimer's disease: inhibitors of Abeta oligomerization. *FASEB J* **18**, 1366-1372.
- [64] Haass C, Selkoe DJ (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 101-112.
- [65] Martins IC, Kuperstein I, Wilkinson H, Maes E, Vanbrabant M, Jonckheere W, Van GP, Hartmann D, D'Hooge R, De SB, Schymkowitz J, Rousseau F (2008) Lipids revert inert Abeta amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice. *EMBO J* **27**, 224-233.
- [66] Apelt J, Schliebs R (2001) Beta-amyloid-induced glial expression of both pro- and anti-inflammatory cytokines in cerebral cortex of aged transgenic Tg2576 mice with Alzheimer plaque pathology. *Brain Res* **894**, 21-30.
- [67] Chao CC, Hu S, Sheng WS, Bu D, Bukrinsky MI, Peterson PK (1996) Cytokine-stimulated astrocytes damage human neurons via a nitric oxide mechanism. *Glia* **16**, 276-284.
- [68] Craft JM, Watterson DM, Van Eldik LJ (2006) Human amyloid beta-induced neuroinflammation is an early event in neurodegeneration. *Glia* **53**, 484-490.
- [69] Hu J, Akama KT, Krafft GA, Chromy BA, Van Eldik LJ (1998) Amyloid-beta peptide activates cultured astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release. *Brain Res* **785**, 195-206.
- [70] Itagaki S, McGeer PL, Akiyama H, Zhu S, Selkoe D (1989) Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Neuroimmunol* **24**, 173-182.
- [71] Johnstone M, Gearing AJ, Miller KM (1999) A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. *J Neuroimmunol* **93**, 182-193.
- [72] Mrak RE, Griffin WS (2005) Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiol Aging* **26**, 349-354.
- [73] Ralay RH, Craft JM, Hu W, Guo L, Wing LK, Van Eldik LJ, Watterson DM (2006) Glia as a therapeutic target: selective suppression of human amyloid-beta-induced upregulation of brain proinflammatory cytokine production attenuates neurodegeneration. *J Neurosci* **26**, 662-670.
- [74] Zipp F, Aktas O (2006) The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* **29**, 518-527.

Anexo 4

Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuite M, Vitorica J, Gutierrez A. (2010). Calretinin interneurons are early targets of extracellular amyloid-beta pathology in PS1/AbetaPP Alzheimer mice hippocampus. *J Alzheimers Dis.*, 21(1):119-132.

Calretinin Interneurons are Early Targets of Extracellular Amyloid- β Pathology in PS1/A β PP Alzheimer Mice Hippocampus

David Baglietto-Vargas^{a,b,1}, Ines Moreno-Gonzalez^{a,b,1}, Raquel Sanchez-Varo^{a,b,1}, Sebastian Jimenez^{b,c,d}, Laura Trujillo-Estrada^{a,b}, Elisabeth Sanchez-Mejias^{a,b}, Manuel Torres^{b,c,d}, Manuel Romero-Acebal^{b,e}, Diego Ruano^{b,c,d}, Marisa Vizuete^{b,c,d}, Javier Vitorica^{b,c,d} and Antonia Gutierrez^{a,b,*}

^a*Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Spain*

^b*Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Spain*

^c*Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia Universidad de Sevilla, Spain*

^d*Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS)-Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Spain*

^e*Servicio de Neurología, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Málaga, Spain*

Handling Associate Editor: Justo Garcia de Yebenes

Accepted 22 February 2010

Abstract. Specific neuronal networks are preferentially affected in the early stages of Alzheimer's disease (AD). The distinct subpopulations of hippocampal inhibitory GABAergic system have been shown to display differential vulnerability to neurodegeneration in AD. We have previously reported a substantial loss of SOM/NPY interneurons, whereas those expressing parvalbumin were unaltered, in the hippocampus of 6 month-old PS1/A β PP transgenic mice. In the present study, we now investigated the pathological changes of hippocampal calretinin (CR) interneurons in this PS1/A β PP model from 2 to 12 months of age. The total number of CR-immunoreactive inhibitory cells was determined by stereology in CA1 and CA2/3 subfields. Our findings show a substantial decrease (35%–45%) of CR-positive interneurons in both hippocampal subfields of PS1/A β PP mice at very early age (4 months) compared to age-matched control mice. This decrease was accompanied by a reduced CR mRNA content as determined by quantitative RT-PCR. However, the number of another hippocampal CR-positive population (belonging to Cajal-Retzius cells) was not affected. The selective early loss of CR-interneurons was parallel to the appearance of extracellular A β deposits, preferentially in CR-axonal fields, and the formation of dystrophic neurites. This specific GABAergic subpopulation plays a crucial role in the generation of synchronous rhythmic activity in hippocampus by controlling other interneurons. Therefore, early alterations of hippocampal inhibitory functionality in AD, caused by select CR-cells neurodegeneration, could result in cognitive impairments seen in initial stages of the disease.

Keywords: Alzheimer's disease, amyloid, hippocampal formation, inhibitory neurons, neurodegeneration, neuropathology, transgenic

INTRODUCTION

Transgenic mice overexpressing mutant familial Alzheimer's disease (AD) genes [amyloid- β protein precursor (A β PP), presenilin-1 (PS1), and PS2] are widely used to study AD-related pathology progres-

¹These authors contributed equally to this work.

*Correspondence to: Antonia Gutierrez, PhD, Dept. Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos, 29071, Málaga, Spain. Tel.: +34 952133344; Fax: +34 952131937; E-mail: agutierrez@uma.es.

sion and the mechanisms underlying neuronal dysfunction [1,2]. However, the pathogenesis of AD is highly complex and these mice display some, but not all, neuropathological lesions of the disease. The most relevant discrepancy is the scarce or delayed neuronal loss in AD models concomitant with the accumulation of extracellular/intracellular amyloid- β (A β). We have recently reported a significant entorhinal principal cell loss in 6 month-old PS1^{M146L}/A β PP751^{SL} mice that was induced by extracellular, not intracellular, A β accumulation [3]. This early principal cell neurodegeneration in the entorhinal cortex was previous to that seen in hippocampus (18 months) as described in AD patients. Moreover, both brain areas in this transgenic mice display a prominent early reduction of SOM/NPY interneurons of GABA system [3,4] as occurs in AD brains [5–12]. Therefore, this PS1/A β PP mouse could mimic the initial stages of the pathology in humans and could be of great interest to analyze the age-dependent vulnerability of different neuronal subpopulations to this disease.

Neurons expressing the calcium binding protein calretinin have also been reported to be affected in the most degenerated brain regions of AD patients [13,14]. Briefly, the density of calretinin (CR) neurons, as well as the dendritic immunostaining, was reduced in the entorhinal cortex of severe AD cases [14]. The presence of CR-positive dystrophic neurites has been reported in AD hippocampus, though the number of CR-cells seemed to be preserved [13]. Some studies have reported the resistance of CR neocortical neurons to degeneration in AD [15,16], however, a layer specific vulnerability of CR-cells associated with the presence of neurofibrillary tangles has been shown in AD neocortex [17]. So far, no study has examined the viability of CR interneurons in an AD model. Therefore, the aim of the current study was to extend our previous results about interneuron vulnerability in AD by evaluating if calretinin interneurons were also affected in the hippocampal formation of our PS1/A β PP model at early stages of A β pathology. This CR-positive GABAergic subpopulation plays a crucial role in the hippocampal activity by controlling other interneurons terminating on different dendritic and somatic compartments of principal cells [18–20]. Here, we have quantitatively determined, by immunohistochemistry and stereological approaches, the number of CR immunoreactive interneurons in CA1 and CA2/3 subfields of 2, 4, 6, and 12 month-old PS1/A β PP mice hippocampus compared to wild type (WT) and single transgenic PS1 littermates. In addition, the CR mRNA content of the hippocam-

pus was assessed by quantitative RT-PCR. As early as 4 months of age, coinciding with the onset of extracellular A β pathology, the cell number of this specific interneuron population, as well as the CR mRNA level, was significantly reduced in the double transgenic AD model.

MATERIALS AND METHODS

Transgenic mice

Male transgenic mice expressing familial AD-causing mutations in the PS1 and A β PP genes were used in this study. The PS1^{M146L}/A β PP751^{SL} mice were obtained by crossing homozygous PS1 mice (expressing human mutant PS1[M146L] under HMG-CoA reductase promoter) to hemizygous A β PP751^{SL} mice (expressing human mutant A β PP751 carrying the Swedish [KM670/671NL] and London [V717I] mutations under the control of the Thy1 promoter). Transgenic mice were generated at the Sanofi-Aventis Centre de Recherche de Paris (Vitry sur Seine, France). The generation and initial characterization of these mice has been reported previously [4,21–23]. The control group included single PS1^{M146L} transgenic mice and non-transgenic mice (WT) of the same genetic background (C57BL/6) and age. Animals of 2-, 4-, 6-, and 12-months of age for each genotype (PS1^{M146L}/A β PP751^{SL}, PS1^{M146L}, and WT) were used. All animal experiments were carried out in accordance with the European Union regulations (Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986) and approved by the committee of animal use for research at Malaga University, Spain (RD 1201/2005 of 10 October 2005).

Tissue preparation

After deep anesthesia with sodium pentobarbital (60 mg/kg), 2, 4, 6, and 12-month-old WT, PS1, and PS1/A β PP transgenic mice were perfused transcardially with 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 followed by 4% paraformaldehyde, 75 mM lysine, 10 mM sodium metaperiodate in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. Brains were post-fixed overnight in the same fixative solution at 4°C, cryoprotected in 30% sucrose, sectioned at 40 μ m thickness in the coronal plane on a freezing microtome and serially collected (each series contained sections that represented 1/7th of the total brain) in cold PBS and 0.02% sodium azide.

Immunohistochemistry

Serial sections from PS1/A β PP, PS1, and WT mice were assayed simultaneously for light microscopy immunohistochemistry as previously reported [3,4]. Briefly, free-floating sections were first pretreated with 3% H₂O₂/3% methanol in PBS and with avidin-biotin Blocking Kit (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). For single immunolabeling, sections were incubated overnight at room temperature with one of the following primary antibodies: rabbit polyclonal anti-calretinin (1:5000 dilution; Swant), mouse monoclonal anti-A β 6E10 (1:1500 dilution; Sigma), or mouse monoclonal anti-reelin (1:1000 dilution; Chemicon). The tissue-bound primary antibody was detected by incubating with the corresponding biotinylated secondary antibody (1:500 dilution, Vector Laboratories), and then followed by 1:2000 streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (Sigma Aldrich). The peroxidase reaction was visualized with 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), 0.03% nickel ammonium sulphate, and 0.01% hydrogen peroxide in PBS. Sections were then mounted onto gelatin-coated slides, dehydrated in graded ethanol, cleared in xylene and coverslipped with DPX (BDH) mounting medium. The specificity of the immune reactions was controlled by omitting the primary antisera.

For double CR/NeuN immunoperoxidase labeling, sections were first immunolabeled with anti-CR using DAB/nickel to visualize the reaction product (blue end product), and then processed for NeuN immunostaining (anti-NeuN monoclonal antibody, 1:1000 dilution; Chemicon) using only DAB as chromogen (brown end product). For double CR/reelin and CR/SMI312 (1:50000 dilution; Covance) immunofluorescence labelings, sections were sequentially incubated with the indicated primary antibodies followed by anti-rabbit Alexa488 secondary antibody (1:1000 dilution; Invitrogen), anti-mouse biotinylated secondary antibody (1:500; Vector Laboratories), and streptavidin-conjugated Alexa568 (1:2000 dilution; Invitrogen). For double NeuN/Propidium iodide fluorescence labeling, sections were first immunolabeled for NeuN using an anti-mouse Alexa488 (1:1000 dilution; Invitrogen) as secondary antibody and then counterstained with propidium iodide (4 μ g/ml). Sections were then mounted onto gelatin-coated slides, coverslipped with 0.01M PBS containing 50% glycerin and 2.5% triethylenediamine and then examined under a confocal laser microscope (Leica TCS-NT).

Stereological analysis

Immunopositive cells for calretinin (CR-positive interneurons and CR-positive Cajal-Retzius population) belonging to the different animal groups (WT, PS1, and PS1/A β PP) and ages (2, 4, 6, and 12 months) were quantified ($n = 5$ per genotype and age; 10–12 sections per animal) in the hippocampal formation (CA1 and CA2/3 subfields) according to the optical fractionator method as previously described [3,4]. Reelin-positive Cajal-Retzius cells at the hippocampal fissure were counted at 6 months of age ($n = 5$ per genotype; 10–12 sections per mouse). Double labeled CR/NeuN cells as well as total NeuN-positive cells were quantified in the stratum radiatum of 4 month-old animals ($n = 4$ per genotype; 10–12 sections/mouse). In addition, total NeuN-positive cells were counted in the stratum radiatum of 2 month-old mice ($n = 4$ per genotype; 10–12 sections/mouse). Briefly, an Olympus BX61 microscope and the NewCAST software package (Olympus, Glostrup, Denmark) were used. The number of neurons was quantified in every 7th section (with a distance of 280 μ m between sections) through the entire antero-posterior extent of the hippocampus (between -0.94 mm anterior and 3.64 mm posterior to Bregman) according to the atlas of Franklin and Paxinos [24]. CA1 and CA2-3 subfields were defined using a 10x objective and the number of neurons was counted using a 100X/1.35 objective. The number of counting frames varied with the hippocampal region or subfield layer analyzed. We used a counting frame of 1874.2 μ m² with step lengths of 78.93 \times 78.93 μ m for CR and reelin counting, and another of 941.42 μ m² with step lengths of 49.47 \times 37.25 μ m for NeuN and double CR/NeuN counting. The total cell number was estimated using the optical fractionator formula, $N = 1/ssf.1/asf.1/hsf. \sum Q^-$, where ssf represents the section sampling fraction, asf is the area sampling fraction, which is calculated by dividing the area sampled with the total area of the layer, hsf stands for the height sampling fraction, which is calculated by dividing the height sampled (10 μ m in this study) with the section thickness, and $\sum Q^-$ is the total count of nuclei sampled for the entire layer [25–27]. The precision of the individual estimations was expressed by the total coefficient of error (CE) [28] calculated using the CEs in each individual animal. The CEs ranged between 0.01 and 0.07. An investigator who was blind to the experimental conditions (age, genotype, and marker) performed neuronal profile counting.

Plaque loading

Quantification of extracellular A β content was performed as previously reported [22]. Briefly, 6E10 immunostained PS1x A β PP sections (seven sections/mouse; $n = 5$ per age) were observed under a Nikon Eclipse 80i microscope using a 4x objective and images acquired with a Nikon DS-5M high-resolution digital camera. Digital images were analyzed using Visilog 6.3 analysis program (Noesis, France). Plaque loading was defined as percentage of total hippocampal area stained for A β excluding principal cell layers intracellular labeling that was removed by manual editing. The hippocampal area in each 4 \times image was manually outlined. The plaque loading (%) for each mouse was estimated and defined as (sum plaque area measured/sum hippocampal area analyzed) \times 100. The sums were taken over all slides sampled and a single plaque burden was computed for each mouse.

RNA and total protein extraction

Anaesthetized mice ($n = 8$ per genotype and age) were killed by decapitation and both hippocampi were dissected, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until use. Total RNA was extracted using the TripureTM Isolation Reagent (Roche) as described previously [3,4,23]. The contaminating DNA in the RNA samples was removed by incubation with DNAase (Sigma-Aldrich) and confirmed by PCR analysis of total RNA samples prior reverse transcription. After isolation, the integrity of the RNA samples was assessed by agarose gel electrophoresis. The yield of total RNA was determined by measuring the absorbance (260/280 nm) of ethanol-precipitated aliquots of the samples. The recovery of RNA was comparable in all groups (1.2–1.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of tissue). The protein pellets, obtained using the TripureTM Isolation Reagent, were resuspended in 4% SDS and 8M urea in 40 mM Tris-HCl, pH 7.4 and rotated overnight at room temperature.

Retrotranscription and real-time RT-PCR

The retrotranscription (RT) was done using random hexamers, 3 μg of total RNA as template and High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) following the manufacturer recommendations [4,22,23]. For real time RT-PCR, gene product was amplified using commercial TaqmanTM probes, following the instruction of the manufacturer (Applied Biosystems), using an ABI Prism 7000 sequence detector (Applied

Biosystems). A standard curve was first constructed, using increasing amounts of cDNA. The slope of the curve indicated optimal PCR conditions (slope 3.2–3.4). The cDNA levels of the different mice were determined using two different housekeepers (i.e., GAPDH and β -actin). The amplification of the housekeepers was done in parallel with the gene to be analyzed. Similar results were obtained using both housekeepers. Thus, the results were normalized using only the GAPDH expression. Results were always expressed using the comparative Ct method, following the Bulletin number 2 from Applied Biosystems. As a control condition, we selected 4-month-old WT mice. In consequence, the expression of the tested gene, for all ages and mice types, was referenced to the expression levels observed in 4-month-old WT mice.

Statistical analysis

Data was expressed as mean \pm SD. The comparisons between several groups (WT, PS1, and PS1/A β PP mice) and ages (2, 4, 6, and 12 months) were done by one-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc multiple comparisons test, and those between two mice groups by two-tailed *t*-test (SigmaStat[®] 2.03, SPSS Inc). In both cases, the significance was set at 95% of confidence.

RESULTS

The number of hippocampal CR-interneurons was significantly reduced at 4 months of age coincident with the appearance of A β deposits

In order to determine the number of CR interneurons in hippocampal CA1 and CA2/3 regions of PS1/A β PP, PS1, and WT mice at 2, 4, 6, and 12 months of age, we have combined specific CR immunohistochemical detection with unbiased stereological cell counting method. The immunohistochemical examination of WT sections revealed CR-positive cells in all layers (more often in principal cell layer) of CA1 regions with multipolar and bipolar or fusiform somata as previously described [29]. Most of these interneurons possessed two dendrites that ran radially and transversed several hippocampal layers (Fig. 1A). Similar observations (cell morphology and spatial location) were done in transgenic mice sections at 2 months of age (Fig. 1B), however, a reduced number of CR-positive cells in the CA subfields in PS1/A β PP animals was observed since

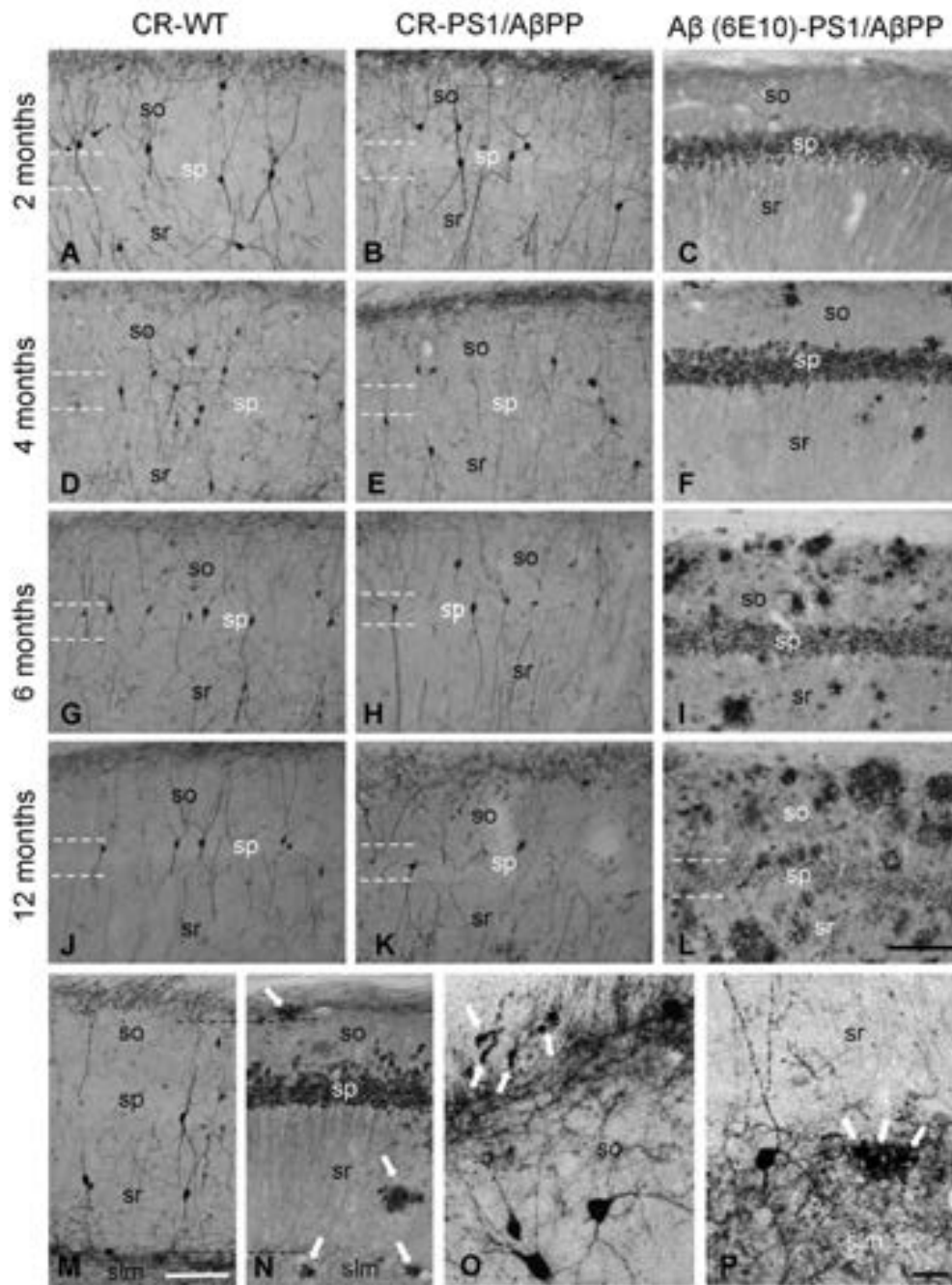


Fig. 1. CR-immunoreactive interneurons in hippocampal CA1 subfield. Light microscopic images of CR immunoreactivity in CA1 subfield of WT (A-D-G-J) and PS1/A β PP (B-E-H-K) mice at 2, 4, 6, and 12 months of age. CR-cells are located in all layers. These cells have smooth or beaded radially oriented dendrites. A decrease in the density of CR-positive cells was observed in PS1/A β PP mice compared to WT mice since 4 months of age. The reduction of CR-positive cells was associated with the apparition of A β extracellular deposition (C-F-I-L). CR-positive plexi were located at stratum oriens/alveus border and in the stratum lacunosum-moleculare (M) where extracellular A β deposits (arrows) were preferentially detected since 4 months of age (N). The presence of CR-positive dystrophic neurites (arrows) was observed in the stratum oriens/alveus (O) and stratum lacunosum-moleculare (P) CR-positive terminal fields at 4 months of age. so: stratum oriens; sp: stratum pyramidale; slm: stratum lacunosum-moleculare; sr: stratum radiatum. Scale bars: 100 μ m (A-L, M and N); 25 μ m (O and P).

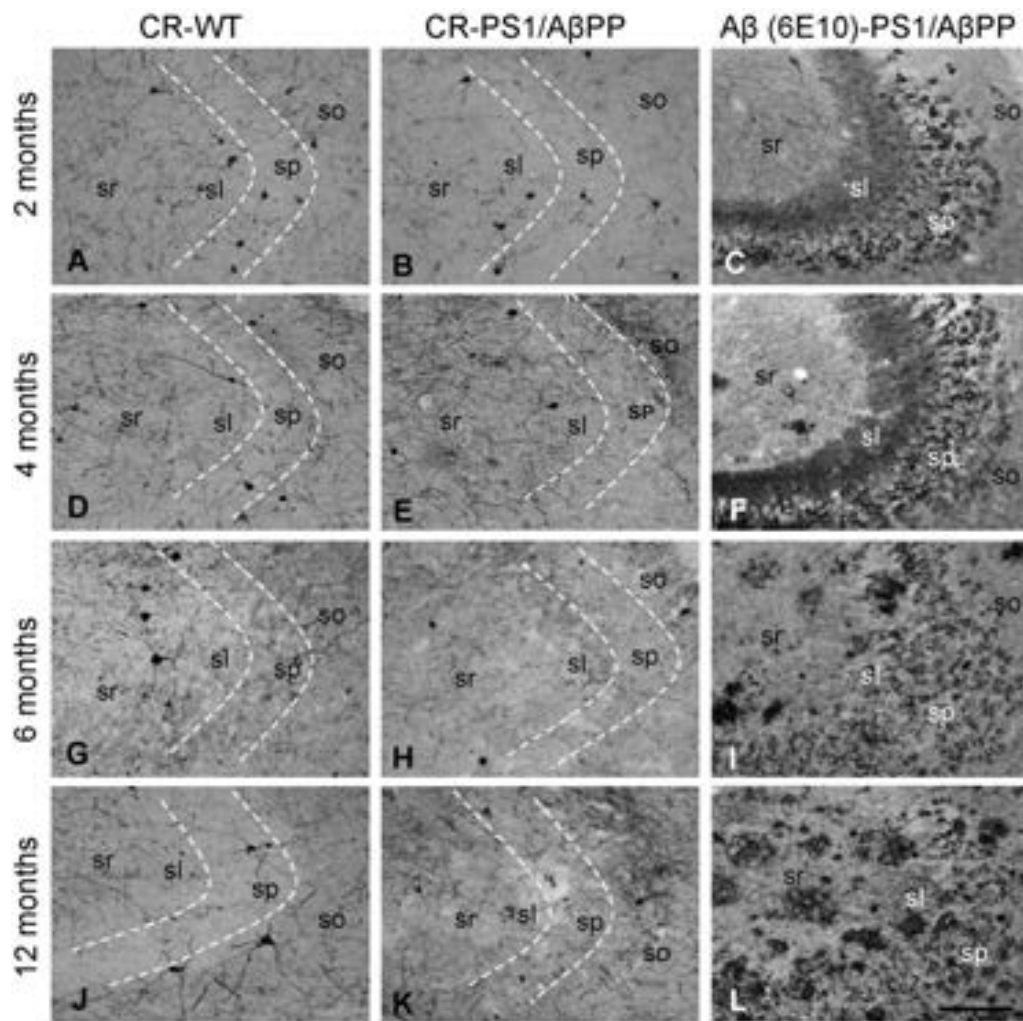


Fig. 2. CR-immunoreactive interneurons in hippocampal CA3 subfield. Light microscopic images of CR-immunoreactivity in CA3 subfield of WT (A-D-G-J) and PS1/A β PP (B-E-H-K) mice at 2, 4, 6, and 12 months of age. Most of CR-cell bodies were in strata oriens and radiatum. The number of CR-positive cell bodies was reduced in PS1/A β PP mice compared to WT mice since 4 months of age. Parallel to the decrease of CR-positive cells there was an increase in the number and size of A β deposits (C-F-I-L). so: stratum oriens; sp: stratum pyramidale; sl: stratum lucidum sr: stratum radiatum. Scale bar: 100 μ m.

4 months of age (Fig. 1E, H, and K) compared to age-matched WT (Fig. 1D, G, and J) or PS1 (not shown) animals. In CA2/3 subfield, the CR-immunoreactive pattern in WT animals was also consistent with earlier descriptions, seeing many CR-positive cells, mainly in strata pyramidale, lucidum, and radiatum (Fig. 2A and D). Double transgenic mice displayed same CR-immunoreactive pattern (Fig. 2B) though, as seen for CA1 subfield, the number of CR-cells was reduced since 4 months of age (Fig. 2E, H and K) in comparison with non-transgenic (Fig. 2D, G and J) or PS1 mice (not shown).

The stereological quantification ($n = 5$ per geno-

type and age; 10–12 sections/animal) showed a significant (one-way ANOVA $p < 0.001$, Bonferroni post-hoc multiple comparison test) reduction in the total number of CR-cells in CA1 ($44 \pm 11.45\%$, $p < 0.001$) and CA2-3 ($33.49 \pm 4.48\%$, $p < 0.01$) subfields of PS1/A β PP mice at 4 months of age compared to WT and PS1 littermates (Fig. 3A and B). At 6 months of age, the decrease in CA1 was $45.75 \pm 14.63\%$ ($p < 0.001$) and in CA2-3 of $38.79 \pm 11.74\%$ ($p < 0.05$). Later, at 12 months of age, CA1 and CA2/3 displayed $38.45 \pm 7.40\%$ ($p < 0.05$) and $37.70 \pm 2.84\%$ ($p < 0.05$) reduction respectively. An age-dependent decrease (one-way ANOVA, Bonferroni $p < 0.05$) in CR-

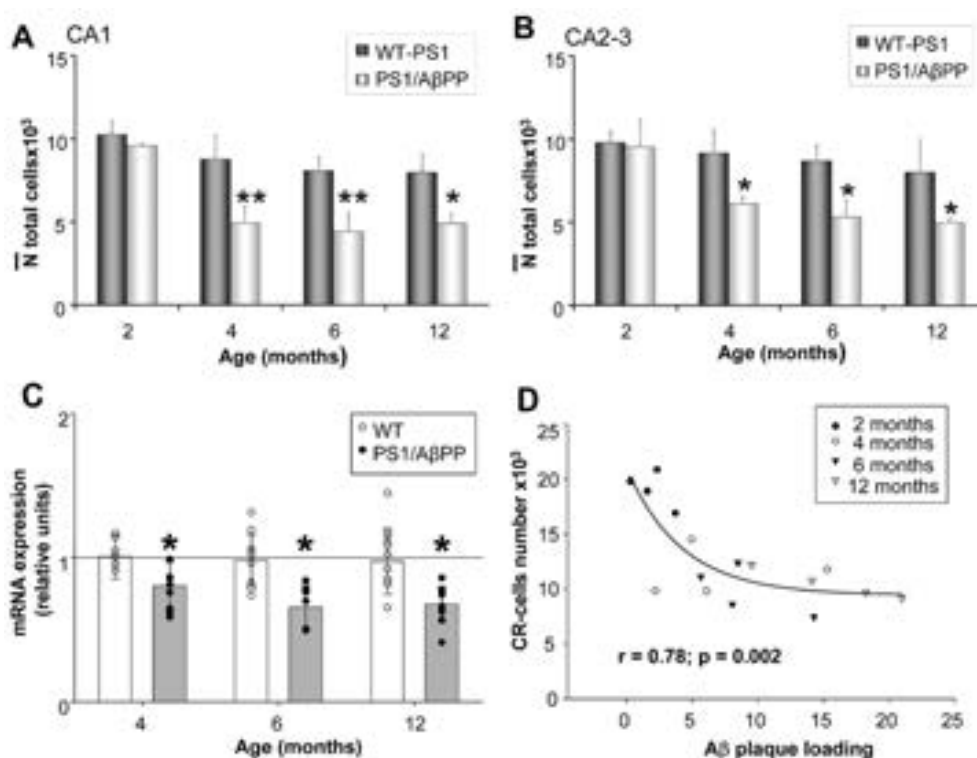


Fig. 3. Significant reduction of CR-interneurons in PS1/A β PP hippocampal formation at early ages. Stereological quantification of CR-positive cells in WT-PS1 and PS1/A β PP ($n = 5$ per genotype and age) demonstrated a significant decrease in PS1/A β PP compared to WT-PS1 mice since 4 months of age in both CA1 (A) and CA2/3 (B) subfields. Data (mean \pm SD) was analyzed by one-way ANOVA $p < 0.001$ (CA1 $F(7,27) = 28.72$ and CA2-3 $F(7,28) = 11.69$), followed by Bonferroni post-hoc multiple comparison test. Significance (** $p < 0.001$, * $p < 0.05$) was indicated in the figure. No differences were detected between PS1 and WT animals and data were pooled. C) CR cells were quantitatively determined in the hippocampus of PS1/A β PP and WT-PS1 mice by RT-PCR ($n = 8$ per genotype and age). The expression of CR mRNA was significantly decreased in PS1/A β PP mice since 4 months of age compared to age-matched control groups. This quantification corresponded to all hippocampal CR cells subpopulations including interneurons, Cajal-Retzius cells, mossy cells and subgranular new born CR expressing neurons. Data (mean \pm SD) was analyzed by one-way ANOVA $p = 0.0001$ ($F(5,54) = 6.5$) followed by Bonferroni post-hoc multiple comparison test. Significance (* $p < 0.05$) was indicated in the figure. D) An inverse biphasic correlation was found between the number of CR-interneurons and the extracellular A β content within same PS1x β PP animals. This relationship was not linear as A β load progressively increased with age whereas CR-cells reduction remained constant after 4–6 months of age.

interneurons number in CA1 region of control animals was detected at 6 ($21.09 \pm 7.77\%$) and 12 months ($22.41 \pm 10.59\%$) of age, compared to 2 months group (Fig. 3A). In CA2/3 region this decrease in WT animals with age was also observed (Fig. 3B) though it did not reach statistical significance. The number of CR interneurons remained unchanged between PS1 transgenic mice and WT mice of same age in CA subfields and data were pooled. Importantly, no differences between PS1/A β PP and WT-PS1 mice were observed at 2 month-old.

Furthermore, we found a similar decrease in the CR mRNA content in PS1/A β PP hippocampus at 4 months of age as assessed by quantitative real time RT-PCR (Fig. 3C). This reduction was of $20.2 \pm 16.7\%$ ($p <$

0.05), $34.6 \pm 15.0\%$ ($p < 0.05$), and $32.4 \pm 12.3\%$ ($p < 0.05$) at 4, 6, and 12 month of age, respectively (one-way ANOVA $p = 0.0001$, Bonferroni post-hoc; $n = 8$ per genotype and age). The assessed mRNA expression accounts for total hippocampal CR-cell populations, including interneurons, Cajal-Retzius cells, hilar mossy cells and subgranular newly born neurons that transiently express CR. Besides this CR-cell heterogeneity there was not much difference between this mRNA quantitative assays and the stereological interneuron counts, indicating that this subpopulation is the most affected one among CR-cells. In fact, and despite that different groups of animals were used for stereological counting and mRNA assays, a good correlation was found between the decrease in both parameters in this AD model (not shown).

The progression of A β pathology was determined by 6E10 immunostaining in adjacent sections of the same PS1/A β PP animals (Figs 1 and 2C, F, I, and L). This monoclonal antibody recognizes A β as well as the precursor protein A β PP. Results showed intense intracellular immunolabeling of pyramidal cell bodies and proximal dendrites at early ages (2 and 4 months) and then intensity diminished with age (more patent at 12 months). However, no immunoreactivity was observed within interneuronal cell bodies at any age tested. Thus, as expected no A β expression or accumulation occurs in hippocampal GABAergic cells in this model. Interestingly, extracellular A β deposits were already detected at 4 months of age, coinciding with the decrease in the number of CR-cells in CA subfields. The apparition of A β deposits has been documented to start at 2.5–3 months of age in this transgenic model [21]. In the hippocampal formation the A β deposits were mainly located in the CR-axonal terminal fields such as stratum lacunosum-moleculare and stratum oriens/alveus boundary (see Fig. 1M and N). The presence of CR-positive dystrophic neurites in both axonal fields was detected since 4 months of age (Fig. 1O and P). These CR-positive dystrophic neurites which were immunoreactive for SMI312 antibody against phosphorylated neurofilaments (not shown) displayed a swollen/globular appearance and were preferentially located around plaques (identified by Congo red staining). The number and size of extracellular deposits, significantly increased with age, as previously reported [23], and this was accompanied by an increase in the number of dystrophic neurites. Therefore, the decrease in the number of CR-positive interneurons seemed to be associated with extracellular, not intracellular, A β accumulation. In support of this, an inverse correlation between CR-cell number and A β plaque loading was found (Fig. 3D). As also expected, the correlation between both parameters was not linear, since the A β loading increased with the age of the animal whereas the CR-cell number, after the initial decrease (from 2 to 6 months) remained practically constant. A similar biphasic response was also observed for hippocampal GABAergic SOM-positive cells in this AD model (unpublished results).

In contrast to CR-interneurons, the CR-positive Cajal-Retzius cells were not affected by extracellular A β pathology

A CR-positive population with small round somata was found in the outer third of the molecular layer

and inner part of the lacunosum-moleculare at the hippocampal fissure (Fig. 4A1-A4). These CR-cells corresponded to Cajal-Retzius neurons which coexpress reelin [30] (Fig. 4B1 and B2) as seen in double CR/reelin immunofluorescence labeling (Fig. 4C). However, not all reelin-positive Cajal-Retzius cells expressed CR (Fig. 4C). The stereological study for CR-positive Cajal-Retzius cells (from 2 to 12 months) showed no differences between control (WT-PS1) and PS1/A β PP groups ($n = 5$ per genotype and age) at any age tested (Fig. 4D). Moreover, the total number of reelin-positive Cajal-Retzius cells at the hippocampal fissure did not display any change between genotypes either (at 6 months the values were 14672.82 ± 58.98 cells for PS1/A β PP mice versus 13462.13 ± 544.63 cells for the control group; $n = 5$ per genotype). However, a significant (one way ANOVA $p < 0.001$, Bonferroni post-hoc) reduction during aging in the total number of CR-positive Cajal-Retzius population was observed in all genotypes (Fig. 4D). This reduction was quite similar for PS1/A β PP ($45.10 \pm 8.54\%$, $57.43 \pm 11.13\%$, $80.49 \pm 23.34\%$ at 4, 6, and 12 months respectively) and control (WT-PS1) animals ($40.26 \pm 8.64\%$, $57.77 \pm 15.43\%$, $80.19 \pm 26.54\%$ at 4, 6, and 12 months respectively) compared to their corresponding 2 month-old group. No differences between PS1 and WT mice were observed and data were pooled. Then, CR-positive Cajal-Retzius cells were equally affected by age in the hippocampus of WT, PS1, and PS1/A β PP mice. These cells were not specifically affected by A β pathology in PS1/A β PP animals. These findings emphasize the selective early vulnerability of CR-positive interneurons compared to other CR-cells in this AD model.

The reduced number of CR-positive interneurons was consequence of an early neurodegenerative process

To determine whether the early reduction of CR-positive interneurons in PS1/A β PP hippocampus reflects neuronal loss or an altered phenotype (loss of CR expression), we have performed parallel stereological counts of CR-positive cells and the total neuronal population in the stratum radiatum of CA1 by using double CR-NeuN peroxidase immunolabeling (Fig. 5A and B). The immunoreaction with the antibody to CR labeled the cytoplasm of this interneuron subpopulation in dark blue color whereas the second immunostaining using anti-NeuN labeled all neuronal nuclei in light brown color. All neurons in strata radiatum and oriens are GABAergic inhibitory neurons, however, the

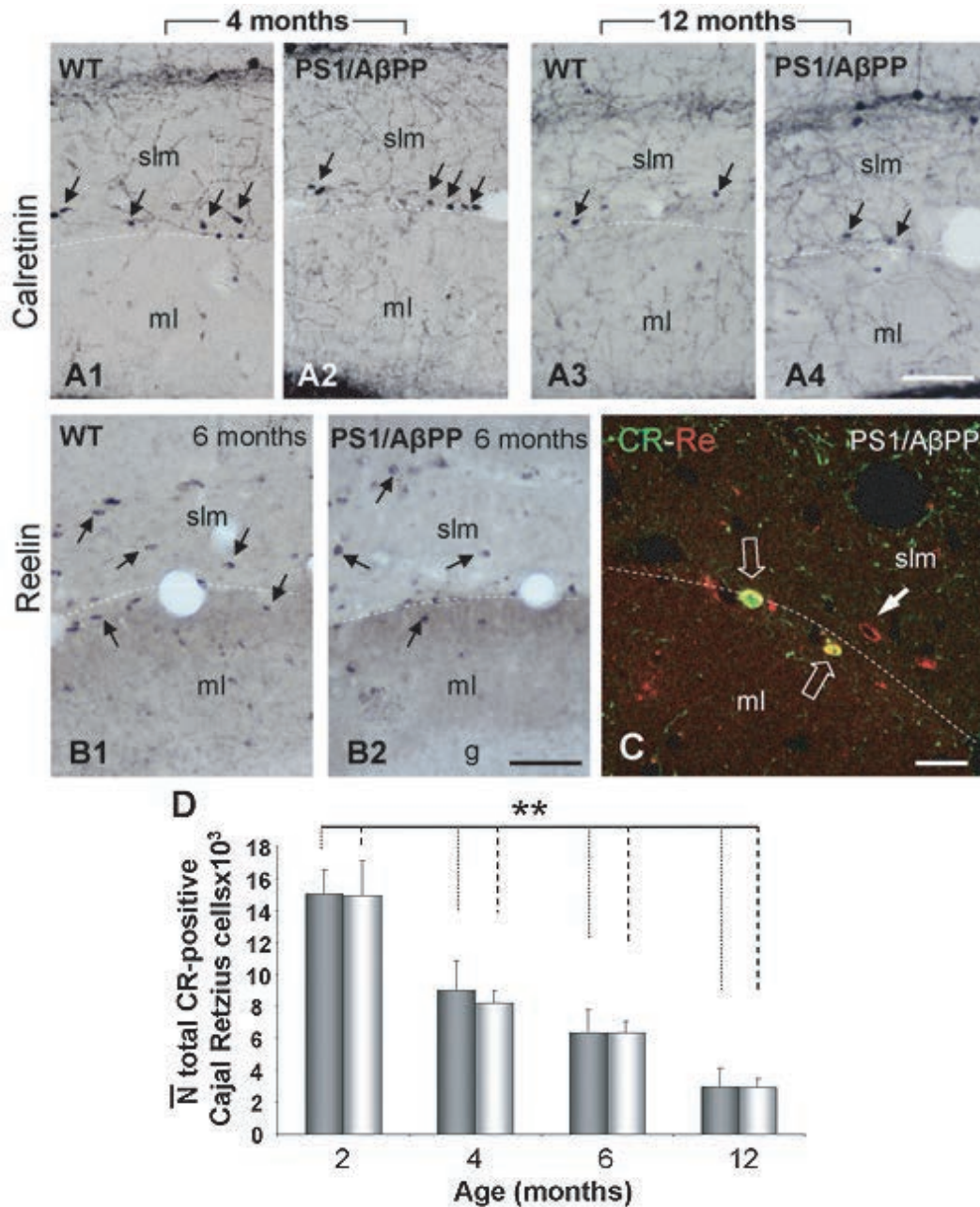


Fig. 4. CR-positive Cajal-Retzius cells are not affected by A β pathology. A) Light microscopy images of CR-positive cells (arrows) in hippocampal fissure of WT (A1 and A3) and PS1/A β PP (A2 and A4) mice at 2 (A1-A2) and 12 (A3-A4) months of age. B) Light microscopy images of Cajal-Retzius cells immunoreactive for reelin (arrows) in the hippocampal fissure of WT (B1) and PS1/A β PP (B2) mice demonstrated no qualitative differences between both genotypes at 6 months of age. C) Double immunofluorescence confocal laser scanning image for CR (green) and reelin (red) in PS1/A β PP hippocampal fissure at 6 months of age. CR-cells also expressed reelin (open arrows), however some reelin-positive cells were CR-negative (white arrow). D) No differences were detected between PS1/A β PP and WT-PS1 control groups ($n = 5$ per genotype and age) in the number of CR-positive Cajal-Retzius cells at all ages tested. However, a significant age-dependent reduction in the number of these cells was found in both PS1 and WT-PS1 groups since 4 months when compared to 2 month-old mice. Data (mean \pm SD) were analyzed by one-way ANOVA $F(7,23) = 45,33$, followed by Bonferroni post-hoc multiple comparison test. Significance $**p < 0.001$ was indicated in the figure. slm: stratum lacunosum-moleculare; ml: molecular layer; g: granular cell layer; Re: reelin. Scale bars: 100 μ m (A1-A3, B1 and B2); 20 μ m (C).

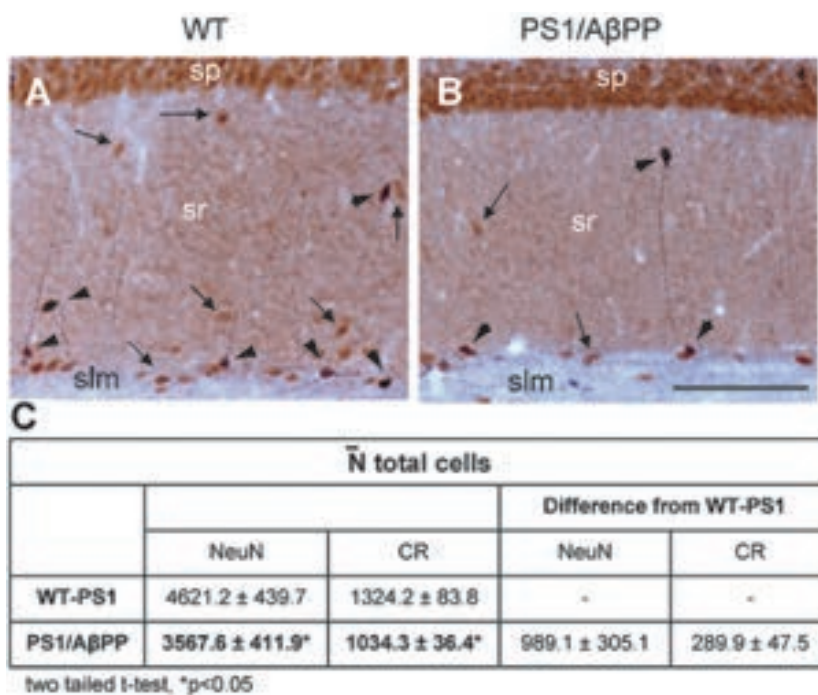


Fig. 5. Loss of CR-positive interneurons in PS1/A β PP hippocampus is due to a neurodegenerative process. A,B) Bright field microscopy images of double peroxidase immunolabeling for CR (dark blue) and NeuN (brown) in CA1 stratum radiatum of 4 month-old WT (A) and PS1/A β PP (B) mice. A reduced number of NeuN-positive cells (arrows) as well as CR-immunoreactive cells (arrowheads) was found in stratum radiatum of PS1/A β PP mice compared to WT. C) Stereological quantification of NeuN- and CR/NeuN-positive cells in CA1 stratum radiatum demonstrated a significant (two tailed t-test, * $p < 0.05$) decrease for NeuN-positive cells ($22.79 \pm 10.15\%$) and for CR-interneurons ($21.89 \pm 9.78\%$) in 4 month-old PS1/A β PP ($n = 4$) compared to age-matched WT-PS1 ($n = 8$) mice. However, the loss of CR-positive interneurons, calculated as the difference between WT-PS1 and PS1/A β PP cell numbers, represented one third of the NeuN cell loss. so: stratum oriens; sp: stratum pyramidale; sr: stratum radiatum; slm: stratum lacunosum-moleculare. Scale bar: 100 μ m.

stratum radiatum has been reported to contain higher proportion of CR interneurons than stratum oriens [31]. Stereological counts (Fig. 5C) showed that the loss of CR-positive cells ($21.89 \pm 9.78\%$, two tailed t-test $p < 0.005$) was quite similar to the NeuN-positive neurons ($22.79 \pm 10.15\%$, two tailed t-test $p < 0.05$) in PS1/A β PP ($n = 4$) respect to age-matched WT-PS1 ($n = 8$) animals at 4 months of age. However, the loss of the CR cells calculated as the difference between WT-PS1 and PS1/A β PP (Fig. 5C) represented only one third of the NeuN-positive cell loss (289.9 ± 47.5 CR cells versus 989.1 ± 305.1 NeuN cells), indicating that other(s) interneuronal population(s), probably SOM/NPY interneurons as previously reported by our group [4], are also affected in this layer. To discard the possibility of early-developmental neuronal deficits in transgenic animals, we have performed stereological counts in the stratum radiatum at 2 months of age. Results showed that the number of NeuN-positive cells in the stratum radiatum (interneurons) of PS1/A β PP mice was not significantly different from age-matched con-

trols ($97.38 \pm 3.16\%$ compared to 2 month-old control group, $n = 4$ /genotype), which further proved that neuronal loss in 4 month-old PS1/A β PP mice was most likely due to neurodegeneration. Moreover, to avoid the possibility that interneuron decrease in 4 month-old double transgenic mice reflected a loss of NeuN-epitope, instead cell death, we have also used a non-immunohistochemical method (fluorescent DNA marker propidium iodide) for cell identification along with NeuN-immunostaining. Although we have not performed stereological count of these double fluorescent labeled sections, the analysis of confocal images (6 sections/mouse, $n = 3$ mice/age) have not revealed propidium iodide-labeled neuronal nuclei (identified by morphological criteria) which were NeuN-negative in PS1/A β PP mice hippocampus at 2 and 4 months of age (results not shown).

Taken together, all these data support the existence of a neurodegenerative process in PS1/A β PP hippocampus at early ages.

DISCUSSION

Select neuronal populations display different sensitivity to degeneration in aging and AD pathology. In this study we have extended our previous results on GABAergic interneuron vulnerability in PS1/A β PP transgenic AD model and demonstrated: 1) a significant reduction (35–45%) in the total number of CR-interneurons in CA1 and CA2/3 hippocampal subfields of PS1/A β PP mice at 4 months of age which was also reflected by a reduced CR mRNA content; 2) the neurodegeneration of CR-positive interneurons was associated to the early appearance of A β deposits and the formation of axonal dystrophies; and 3) this early degenerative process was selective for CR-interneurons whereas another hippocampal CR cells (CR-positive Cajal-Retzius cells) were not affected by A β pathology.

In the hippocampus, there is a great cellular diversity of GABAergic interneurons which provide general inhibition by contacting with distinct domains of principal cells (for review, see [32]). The different classes of inhibitory neurons can be recognized on the basis of their morphological, molecular, and physiological features. Among these GABA interneurons, those expressing the calcium binding protein calretinin represent a small percent, about 10% [31], however, they play a crucial role regulating the activity of other GABAergic inhibitory interneurons and subsequently the excitatory action of principal cells [19]. The targets of CR-axons are interneurons (containing VIP, calbindin, or somatostatin) which terminate on different somatodendritic domains of principal cells. Decrease of CR-interneurons may be then associated with functional decline of inhibitory activity in hippocampus and memory impairment. The relevance of calretinin and other calcium binding proteins in neurodegenerative diseases, and particularly AD, has been supported by several studies [13,14,33–35]. Our findings of reduced number of CR-interneurons, as well as the presence of CR-positive dystrophic neurites, in an AD model are then consistent with those observations seen in humans. Supporting the existence of altered CR networks in AD pathology, Popovic and colleagues [36] have recently reported decreased CR-immunoreactivity in the dentate gyrus hilar cells (mostly excitatory mossy cells) of another AD model.

We have demonstrated that reduction of CR-interneurons is an early event (4 months), preceding even SOM/NPY cells loss (6 months; see [4]) during disease progression in the hippocampal formation of our AD model. Our findings also show a diverse sensi-

tivity to degeneration within the CR-interneuron population in the hippocampal formation. In particular, a subset (approximately 40% of total population) was highly susceptible whereas the rest of the population (60%) was unaffected even at late ages (there was no progressive decline in CR-positive interneurons with aging and increased A β pathology; see Fig. 3D). We do not know the reasons that determine this differential early vulnerability to A β pathology, but certainly it will be of great interest to identify the molecular/physiological properties of both CR-positive interneuronal subsets (vulnerable/resistant) to uncover the underlying mechanisms that lead to neurodegeneration/survival. Nevertheless, the loss of this vulnerable CR-interneuron subset could be responsible, in part, of first signs of hippocampal functional abnormalities.

Supporting the selective vulnerability of CR-interneurons, and the extensive heterogeneity among hippocampal CR-cells, we have also shown that CR-positive Cajal-Retzius cells, located in the hippocampal fissure, were not affected by the course of disease in this double transgenic mice. However, there was a substantial age-dependent reduction (reaching 80% at 12 months) of this cell population in both PS1/A β PP and control animals.

In addition, we demonstrated that the reduction of CR-interneurons in this PS1/A β PP model is due to an early neurodegenerative process rather than loss of CR-expression. Stereological analysis of double CR-NeuN immunolabeling in the stratum radiatum of CA1 subfield showed that the total number of interneuronal cells (NeuN-positive) significantly decreased at very early age (4 months). The loss of CR-cells represented 30% of the neurodegenerative process in this layer, indicating that other GABAergic neurons could also be affected. Supporting these data, we have previously demonstrated an early neurodegeneration of SOM/NPY cells in this AD model [4], however, other interneuronal populations (such as cholecystokinin positive interneurons) could be also affected (see [37]).

The mechanism underlying this early selective death of CR-interneurons remains to be elucidated, however, since hippocampal interneurons in this AD model do not express mutated hA β PP (see [4]), intracellular A β accumulation is not the causative neurotoxic agent. Instead extracellular factors should be the major agents involved. In this sense, we have described an association between extracellular A β and/or cytotoxic glial environment and the neurodegeneration of hippocampal principal cells [23] in layer V pyramidal cells of the entorhinal cortex in this PS1/A β PP

mice [3]. Supporting the direct impact of extracellular A β on neuronal death, Liu and colleagues [38] recently reported a relationship between forebrain extracellular A β accumulation and the progressive degeneration of monoaminergic afferent axons and their corresponding subcortical cell bodies. In concordance with this, we have observed abundant A β deposits in the CR-axonal plexi in stratum lacunosum moleculare and in stratum oriens/alveus boundary of CA1-CA3 regions at early ages in our model. Moreover, CR-positive dystrophic neurites were seen in these axonal fields. Then, we consider the possibility that extracellular A β could directly affect CR axon terminals and stimulate a neurodegenerative process toward their cell bodies. In fact, A β peptides are well established as the principal factors for the pathological events observed in AD [39–41] and there is compelling evidence showing that alterations in axonal transport play critical role in the pathogenesis of AD [42–45].

Instead of a direct neurotoxic effect of A β onto CR-cells, it could be also argued that A β might exert an indirect effect by eliciting a local cytotoxic inflammatory reaction that may in turn produce this neuronal death. In relation to this, our PS1/A β PP mice develop an extensive forebrain inflammatory response since 4 months of age, with a substantial microglial and astroglial activation [3,23]. However, the hippocampal glial activation at early ages, and on contrary to that in entorhinal cortex, might be neuroprotective and only at late ages (18 months) displayed a neurotoxic profile. Therefore, we believe that CR-positive hippocampal interneuron population is most likely affected by extracellular A β directly. On the other hand, we cannot excluded that death of these CR cells could be related to a deafferentation process. These interneurons receive afferents from the GABAergic component of the septohippocampal pathway and from serotonergic raphe neurons [46]. Whether these neurons are affected in this model and precede CR-cells degeneration still need to be investigated.

In conclusion, this work provides the first evidence that hippocampal CR-interneurons are preferential early targets in a transgenic model with AD-like pathology. The loss of these GABAergic neurons may be influenced by the early onset of amyloid deposits in this brain area and the induction of axonal pathology, however, the exact molecular mechanisms responsible for this selective neurodegeneration are still unknown. Finally, our findings highlight the diversity within this neurochemically identified GABAergic population and further supports the notion that A β pathology affects specific neuronal subsets.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants PI06/0556-PS09/00099 (to AG), PI06/0567-PS09/00151 (to JV) and PI06/0781-PS09/00848 (to DR) from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) -Instituto de Salud Carlos III- Spain. DB-V, IM-G and SJ were the recipients of a contract from CIBERNED. RS-V, ES-M and MT held a PhD fellowship from Spain FPU or FPI programs.

Authors' disclosures available online (<http://www.j-alz.com/disclosures/view.php?id=348>).

REFERENCES

- [1] Morrisette DA, Parachikova A, Green KN, LaFerla FM (2009) Relevance of transgenic mouse models to human Alzheimer disease. *J Biol Chem* **284**, 6033-6037.
- [2] Duyckaerts C, Potier MC, Delatour B (2008) Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol* **115**, 5-38.
- [3] Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Del Rio JC, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuet M, Vitorica J, Gutierrez A (2009) Extracellular amyloid-beta and cytotoxic glial activation induce significant entorhinal neuron loss in young PS1M146L/APP751SL mice. *J Alzheimers Dis* **18**, 755-776.
- [4] Ramos B, Baglietto-Vargas D, Del Rio JC, Moreno-Gonzalez I, Santa-Maria C, Jimenez S, Caballero C, Lopez-Tellez JF, Khan ZU, Ruano D, Gutierrez A, Vitorica J (2006) Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1xAPP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **27**, 1658-1672.
- [5] Beal MF, Mazurek MF, Svendsen CN, Bird ED, Martin JB (1986) Widespread reduction of somatostatin-like immunoreactivity in the cerebral cortex in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **20**, 489-495.
- [6] Beal MF, Mazurek MF, Chattha GK, Svendsen CN, Bird ED, Martin JB (1986) Neuropeptide Y immunoreactivity is reduced in cerebral cortex in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **20**, 282-288.
- [7] Beal MF, Benoit R, Mazurek MF, Bird ED, Martin JB (1986) Somatostatin-28(1-12)-like immunoreactivity is reduced in Alzheimer's disease cerebral cortex. *Brain Res* **368**, 380-383.
- [8] Nakamura S, Vincent SR (1986) Somatostatin- and neuropeptide Y-immunoreactive neurons in the neocortex in senile dementia of Alzheimer's type. *Brain Res* **370**, 11-20.
- [9] Chan-Palay V (1987) Somatostatin immunoreactive neurons in the human hippocampus and cortex shown by immunogold/silver intensification on vibratome sections: coexistence with neuropeptide Y neurons, and effects in Alzheimer-type dementia. *J Comp Neurol* **260**, 201-223.
- [10] Gaspar P, Duyckaerts C, Febvret A, Benoit R, Beck B, Berger B (1989) Subpopulations of somatostatin 28-immunoreactive neurons display different vulnerability in senile dementia of the Alzheimer type. *Brain Res* **490**, 1-13.
- [11] Grouselle D, Winsky-Sommerer R, David JP, Delacourte A, Dournaud P, Epelbaum J (1998) Loss of somatostatin-like immunoreactivity in the frontal cortex of Alzheimer patients

- carrying the apolipoprotein epsilon 4 allele. *Neurosci Lett* **255**, 21-24.
- [12] Davis KL, Mohs RC, Marin DB, Purohit DP, Perl DP, Lantz M, Austin G, Haroutunian V (1999) Neuropeptide abnormalities in patients with early Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* **56**, 981-987.
- [13] Brion JP, Resibois A (1994) A subset of calretinin-positive neurons are abnormal in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **88**, 33-43.
- [14] Mikkonen M, Alafuzoff I, Tapiola T, Soininen H, Miettinen R (1999) Subfield- and layer-specific changes in parvalbumin, calretinin and calbindin-D28K immunoreactivity in the entorhinal cortex in Alzheimer's disease. *Neuroscience* **92**, 515-532.
- [15] Fonseca M, Soriano E (1995) Calretinin-immunoreactive neurons in the normal human temporal cortex and in Alzheimer's disease. *Brain Res* **691**, 83-91.
- [16] Hof PR, Nimchinsky EA, Celio MR, Bouras C, Morrison JH (1993) Calretinin-immunoreactive neocortical interneurons are unaffected in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **152**, 145-148.
- [17] Sampson VL, Morrison JH, Vickers JC (1997) The cellular basis for the relative resistance of parvalbumin and calretinin immunoreactive neocortical neurons to the pathology of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* **145**, 295-302.
- [18] Cobb SR, Buhl EH, Halasy K, Paulsen O, Somogyi P (1995) Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature* **378**, 75-78.
- [19] Gulyas AI, Hajos N, Freund TF (1996) Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. *J Neurosci* **16**, 3397-3411.
- [20] Schurmans S, Schiffmann SN, Gurden H, Lemaire M, Lipp HP, Schwam V, Pochet R, Imperato A, Bohme GA, Parmentier M (1997) Impaired long-term potentiation induction in dentate gyrus of calretinin-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10415-10420.
- [21] Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, Planche M, Canton T, Jedidi I, Gohin M, Wirths O, Bayer TA, Langui D, Duyckaerts C, Tremp G, Pradier L (2003) Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with Abeta deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp Neurol* **184**, 247-263.
- [22] Caballero C, Jimenez S, Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Gavilan MP, Ramos B, Del Rio JC, Vizuete M, Gutierrez A, Ruano D, Vitorica J (2007) Inter-individual variability in the expression of the mutated form of hPS1M146L determined the production of Abeta peptides in the PS1xAPP transgenic mice. *J Neurosci Res* **85**, 787-797.
- [23] Jimenez S, Baglietto-Vargas D, Caballero C, Moreno-Gonzalez I, Torres M, Sanchez-Varo R, Ruano D, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J (2008) Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *J Neurosci* **28**, 11650-11661.
- [24] Franklin KBJ, Paxinos G (2008) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, Academic Press.
- [25] Dorph-Petersen KA, Nyengaard JR, Gundersen HJ (2001) Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. *J Microsc* **204**, 232-246.
- [26] Schmitz C, Hof PR (2005) Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience* **130**, 813-831.
- [27] West MJ (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *Trends Neurosci* **22**, 51-61.
- [28] Gundersen HJ, Jensen EB, Kieu K, Nielsen J (1999) The efficiency of systematic sampling in stereology – reconsidered. *J Microsc* **193**, 199-211.
- [29] Matyas F, Freund TF, Gulyas AI (2004) Immunocytochemically defined interneuron populations in the hippocampus of mouse strains used in transgenic technology. *Hippocampus* **14**, 460-481.
- [30] Abraham H, Meyer G (2003) Reelin-expressing neurons in the postnatal and adult human hippocampal formation. *Hippocampus* **13**, 715-727.
- [31] Jinno S, Kosaka T (2006) Cellular architecture of the mouse hippocampus: a quantitative aspect of chemically defined GABAergic neurons with stereology. *Neurosci Res* **56**, 229-245.
- [32] Klausberger T, Somogyi P (2008) Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* **321**, 53-57.
- [33] Heizmann CW, Braun K (1992) Changes in Ca(2+)-binding proteins in human neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* **15**, 259-264.
- [34] Iacopino AM, Christakos S (1990) Specific reduction of calcium-binding protein (28-kilodalton calbindin-D) gene expression in aging and neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4078-4082.
- [35] Palop JJ, Jones B, Kekoni L, Chin J, Yu GQ, Raber J, Masliah E, Mucke L (2003) Neuronal depletion of calcium-dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer's disease-related cognitive deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9572-9577.
- [36] Popovic M, Caballero-Bleda M, Kadish I, Van GT (2008) Subfield and layer-specific depletion in calbindin-D28K, calretinin and parvalbumin immunoreactivity in the dentate gyrus of amyloid precursor protein/presenilin 1 transgenic mice. *Neuroscience* **155**, 182-191.
- [37] Mazurek MF, Beal MF (1991) Cholecystokinin and somatostatin in Alzheimer's disease postmortem cerebral cortex. *Neurology* **41**, 716-719.
- [38] Liu Y, Yoo MJ, Savonenko A, Stirling W, Price DL, Borchelt DR, Mamounas L, Lyons WE, Blue ME, Lee MK (2008) Amyloid pathology is associated with progressive monoaminergic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* **28**, 13805-13814.
- [39] Haass C, Selkoe DJ (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 101-112.
- [40] Suh YH, Checler F (2002) Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol Rev* **54**, 469-525.
- [41] Walsh DM, Selkoe DJ (2007) A beta oligomers – a decade of discovery. *J Neurochem* **101**, 1172-1184.
- [42] De Vos KJ, Grierson AJ, Ackerley S, Miller CC (2008) Role of axonal transport in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Neurosci* **31**, 151-173.
- [43] Smith KD, Kallhoff V, Zheng H, Pautler RG (2007) *In vivo* axonal transport rates decrease in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroimage* **35**, 1401-1408.
- [44] Stokin GB, Lillo C, Falzone TL, Brusch RG, Rockenstein E, Mount SL, Raman R, Davies P, Masliah E, Williams DS, Goldstein LS (2005) Axonopathy and transport deficits early

- in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science* **307**, 1282-1288.
- [45] Zhu X, Moreira PI, Smith MA, Perry G (2005) Alzheimer's disease: an intracellular movement disorder? *Trends Mol Med* **11**, 391-393.
- [46] Acsady L, Halasy K, Freund TF (1993) Calretinin is present in non-pyramidal cells of the rat hippocampus-III. Their inputs from the median raphe and medial septal nuclei. *Neuroscience* **52**, 829-841.

Anexo 5

Jimenez S, Torres M, Vizuite M, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Trujillo-Estrada L, Carmona-Cuenca I, Caballero C, Ruano D, Gutierrez A, Vitorica J. (2011). Age-dependent accumulation of soluble amyloid beta (A β) oligomers reverses the neuroprotective effect of soluble amyloid precursor protein-alpha (sAPP(alpha)) by modulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-GSK-3beta pathway in Alzheimer mouse model. *J Biol Chem.*, 286(21):18414-18425.

Age-dependent Accumulation of Soluble Amyloid β ($A\beta$) Oligomers Reverses the Neuroprotective Effect of Soluble Amyloid Precursor Protein- α (sAPP α) by Modulating Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Akt-GSK-3 β Pathway in Alzheimer Mouse Model^{*[5]}

Received for publication, December 8, 2010, and in revised form, March 4, 2011. Published, JBC Papers in Press, April 1, 2011, DOI 10.1074/jbc.M110.209718

Sebastian Jimenez^{‡§¶1,2}, Manuel Torres^{‡§¶1,2}, Marisa Vizuete^{‡§¶}, Raquel Sanchez-Varo^{§||2}, Elisabeth Sanchez-Mejias^{§||3}, Laura Trujillo-Estrada^{§||3}, Irene Carmona-Cuenca^{‡§¶}, Cristina Caballero^{‡§¶}, Diego Ruano^{‡§¶}, Antonia Gutierrez^{§||}, and Javier Vitorica^{‡§¶4}

From the [‡]Departamento Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla, the ^{||}Departamento Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071 Málaga, the [§]Centro de Investigación Biomédica en Red Sobre Enfermedades Neurodegenerativas, 41013 Sevilla, and the [¶]Instituto de Biomedicina de Sevilla-Hospital Universitario Virgen del Rocío/Consejo Superior de Investigaciones Científicas/Universidad de Sevilla, 41013 Sevilla, Spain

Neurotrophins, activating the PI3K/Akt signaling pathway, control neuronal survival and plasticity. Alterations in NGF, BDNF, IGF-1, or insulin signaling are implicated in the pathogenesis of Alzheimer disease. We have previously characterized a bigenic PS1 \times APP transgenic mouse displaying early hippocampal $A\beta$ deposition (3 to 4 months) but late (17 to 18 months) neurodegeneration of pyramidal cells, paralleled to the accumulation of soluble $A\beta$ oligomers. We hypothesized that PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway could be involved in this apparent age-dependent neuroprotective/neurodegenerative status. In fact, our data demonstrated that, as compared with age-matched nontransgenic controls, the Ser-9 phosphorylation of GSK-3 β was increased in the 6-month PS1 \times APP hippocampus, whereas in aged PS1 \times APP animals (18 months), GSK-3 β phosphorylation levels displayed a marked decrease. Using N2a and primary neuronal cell cultures, we demonstrated that soluble amyloid precursor protein- α (sAPP α), the predominant APP-derived fragment in young PS1 \times APP mice, acting through IGF-1 and/or insulin receptors, activated the PI3K/Akt pathway, phosphorylated the GSK-3 β activity, and in consequence, exerted a neuroprotective action. On the contrary, several oligomeric $A\beta$ forms, present in the soluble fractions of aged PS1 \times APP mice, inhibited the induced phosphorylation of Akt/GSK-3 β and decreased the neuronal survival. Furthermore, synthetic $A\beta$ oligomers blocked the effect mediated by different

neurotrophins (NGF, BDNF, insulin, and IGF-1) and sAPP α , displaying high selectivity for NGF. In conclusion, the age-dependent appearance of APP-derived soluble factors modulated the PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway through the major neurotrophin receptors. sAPP α stimulated and $A\beta$ oligomers blocked the prosurvival signaling. Our data might provide insights into the selective vulnerability of specific neuronal groups in Alzheimer disease.

The molecular mechanisms underlying the selective neurodegeneration in Alzheimer disease (AD)⁵ remain unclear. Amyloid- β ($A\beta$) peptides, proteolytically excised from the amyloid precursor protein (APP), are considered the primary pathological agents in AD. However, their precise modes of action, toxic conformational forms, and molecular targets are still controversial (for review see Ref. 1). Transgenic mouse models, overexpressing mutated forms of human APP, are widely used to study AD pathogenesis. These models develop extensive $A\beta$ deposition in the disease-vulnerable brain regions (such as hippocampus); however, neurons are well protected until late ages. The factors and pathways maintaining neuronal integrity at young/middle ages in these AD models and those inducing neurodegeneration in the aged animals remains to be defined.

NGF, BDNF, IGF-1, and insulin are trophic factors critical for neuronal survival and plasticity, underlying memory, and learning (2–4) and could be implicated in AD development. Changes in growth factor expression and distribution, as well in their receptors (TrkA, TrkB, p75NTR, IGF-1R, and insulin-R), have been reported in AD and AD models (5). In fact, it has been suggested that the imbalance between NGF, its precursor pro-NGF, and the high (TrkA) and low (p75NTR) affinity NGF receptors seems to be a crucial factor underlying neurodegen-

* This work was supported in part by Grants PS09/00151 (to J. V.), PS09/00099 (to A. G.), and PS09/00848 (to D. R.) from the Fondo de Investigación Sanitaria (Instituto de Salud Carlos III, Spain) and by Grants CTS-4795 (to J. V.) and SAS PI-0496/2009 (to A. G.) from Junta de Andalucía (Spain).

[5] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. 1–4.

¹ Both authors contributed equally to this work.

² Recipient of a contract from the Centro de Investigación Biomédica en Red Sobre Enfermedades Neurodegenerativas.

³ Recipient of a Ph.D. fellowship from the Formación de Profesorado Universitario (FPU) Program (Spain).

⁴ To whom correspondence should be addressed: Dept. of Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla, Spain. Tel.: 34-954556670; E-mail: vitorica@us.es.

⁵ The abbreviations used are: AD, Alzheimer disease; APP, amyloid precursor protein; sAPP, soluble APP; $A\beta$, amyloid β -protein; tg, transgenic; Tric, N-[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycine; ADDL, $A\beta$ -derived diffusible ligand.

eration in AD (6, 7). Furthermore, defects in IGF-1R and insulin-R signaling are associated with amyloid plaque and neurofibrillary tangle pathology (8). In this sense, it has been reported that insulin resistance, central to type II diabetes, was implicated in the pathogenesis of AD. Alterations in IGF-1R, insulin-R, and IRS-1/2 in AD are implicated in insulin resistance (9). In fact, AD has been considered as a brain-specific “type III diabetes” (10, 11). Insulin administration facilitates memory in patients with AD (12), and IGF-1 is protective against the development of A β pathology (13). However, the mechanisms implicated in the A β -mediated insulin resistance are still unknown.

Trophic factors promote neuronal survival largely through the PI3K/Akt signaling pathway (14). After activation, phospho-Akt phosphorylates and inhibits the glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β). The “GSK3 hypothesis of AD” (15) proposed that the overactivity of GSK-3 β accounts for several features of this pathology such as memory impairment, Tau phosphorylation, increased amyloid production, microglia-mediated inflammation, and neuronal death. In fact, GSK-3 β mediates the hyper-phosphorylation of Tau (16) and produces impairments in learning and memory by preventing the induction of long term potentiation (17). GSK-3 β activity also is critical for inflammatory cell differentiation, migration, and secretion of pro-inflammatory cytokines (18), so it could potentially heighten microglia-mediated inflammatory responses in the local vicinity of A β plaques. Moreover, GSK-3 β modulates key steps of the major apoptotic signaling pathways (the mitochondrial intrinsic apoptotic and the death receptor-mediated extrinsic apoptotic pathways) (19).

Increasing evidence suggests that the PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway is directly impacted by A β exposure and is altered in AD brains. In this sense, soluble (or diffusible) A β oligomers (putative toxic agents in AD) (20, 21) have been associated with Tau hyperphosphorylation (22), inhibition of long term potentiation, disruption of memory, loss of dendritic spine density (23), neuronal death (24, 25), and neurotoxic inflammatory response (26). Furthermore, A β oligomers have been shown to modulate the expression and density of insulin receptors through the modulation of the PI3K/Akt pathway (27), and alterations in the levels of phosphorylated Akt substrates have been reported in AD patients (28).

In this study, we have addressed the possible age-dependent variations in the GSK-3 β phosphorylation in our PS1 \times APP tg model. This model developed early A β (3 to 4 months) plaques (29–31) but late (17 to 18 months) hippocampal neuronal degeneration, paralleled with the accumulation of soluble A β oligomers (26). The molecular changes that drive to this apparent age-dependent protective/degenerative neuronal condition are still unresolved. We hypothesized that the PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway could be involved. Using *in vivo* and *in vitro* assays, we report that natural and synthetic A β oligomers, acting through growth factor receptors, inhibit the pro-survival signaling PI3K/Akt/GSK-3 β . Moreover, at early ages, despite the A β plaques, soluble APP α , acting through IGF-1 and insulin receptors, activated the pro-survival PI3K-Akt-GSK-3 β pathway that might account for the lack of neurodegeneration in most transgenic models at these ages.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Antibodies—A11 and 6E10 antibodies were purchased from Invitrogen and Signet Laboratories, respectively. Anti-soluble APP α was provided by Immuno-Biological Laboratories. Anti-phospho-GSK-3 β (Ser-9); phospho-Akt (Ser-473); phospho-Akt (Thr-308); phospho-IGF1 receptor β (Tyr-1135/1136); pTrkA-B (TrkA, Tyr-674/675; TrkB, Tyr-706/707) were from Cell Signaling Laboratory. Anti-phospho-insulin receptor (Tyr-1150/1151) was purchased from Millipore. Monoclonal anti-human PHF-Tau (Clone AT100) was purchased from Innogenetics. Anti-phospho- and total β -catenin antibodies were from Cell Signaling Laboratory and Abcam, respectively. Anti- β -actin was purchased from Sigma.

Transgenic Mice—The generation and initial characterization of the PS1_{M146L} \times APP_{751sl} (PS1 \times APP) tg mice has been reported previously (29). This double tg mice (C57BL/6 background) were generated by crossing homozygotic PS1_{M146L} mice with heterozygotic Thy1-APP751SL mice (all tg mice were provided by Transgenic Alliance, IFFA Credo, Lyon, France). Mice represented F10–F15 offspring of heterozygous tg mice. Only male mice were used in this work. Age-matched PS1_{M146L} and nontransgenic (WT) male mice of the same genetic background (C57BL/6) were used as controls.

For glucose determination, the anesthetized (sodium pentobarbital; 60 mg/kg) animals were bled (50 μ l) from the tail. The glucose levels were similar between ages and genotypes (in mM: 6.4 ± 1.4 , 5.4 ± 1.2 ; 7.3 ± 1.2 and 6.5 ± 1.4 , $n = 7$, for 6 or 18 months, WT and PS1 \times APP, respectively). After bleeding, the mice were killed by decapitation, and both hippocampi were dissected, frozen in liquid N₂, and stored at -80°C until use. All animal experiments were performed in accordance with the guidelines of the Committee of Animal Research of the University of Seville (Spain) and the European Union Regulations.

RNA and Total Protein Extraction—Total RNA was extracted using the TripureTM isolation reagent (Roche Applied Science) as described previously (30, 31).

The contaminating DNA in the RNA samples was removed by incubation with DNase (Sigma) and confirmed by PCR analysis of total RNA samples prior to reverse transcription (RT). After isolation, the integrity of the RNA samples was assessed by agarose gel electrophoresis. The yield of total RNA was determined by measuring the absorbance (260/280 nm) of ethanol-precipitated aliquots of the samples. The recovery of RNA was comparable in all groups (1.2–1.5 μ g/mg of tissue). The protein pellets, obtained using the TripureTM isolation reagent, were resuspended in 4% SDS and 8 M urea in 40 mM Tris-HCl, pH 7.4, and rotated overnight at room temperature (30, 31).

Retrotranscription and Real Time RT-PCR—The retrotranscription (RT) was done using random hexamers, and 3 μ g of total RNA as template and high capacity cDNA archive kit (Applied Biosystems) following the manufacturer recommendations (30, 31). For real time RT-PCR, each specific gene product was amplified using commercial TaqManTM probes, following the instructions of the manufacturer (Applied Biosystems), using an ABI Prism 7000 sequence detector (Applied Biosystems). For each assay, a standard curve was first constructed, using increasing amounts of cDNA. In all cases, the

A β Oligomers Reverse Neuroprotective Effect of sAPP α

slope of the curves indicated optimal PCR conditions (slope 3.2–3.4). The cDNA levels of the different mice were determined using two different housekeepers (*i.e.* GAPDH and β -actin). The amplification of the housekeepers was done in parallel with the gene to be analyzed. Similar results were obtained using both housekeepers. Thus, the results were normalized using only the GAPDH expression.

Independently of the gene analyzed, the results were always expressed using the comparative *Ct* method, following Bulletin 2 from Applied Biosystems. As a control condition, we selected 6-month-old WT mice. In consequence, the expression of all tested genes, for all ages and mouse types, was referenced to the expression levels observed in 6-month-old WT mice.

A β 42 Peptide Preparation—To prepare the A β 42 peptides, we allowed synthetic lyophilized A β (1–42) peptide (human sequence, Anaspec) to equilibrate, at 20–23 °C, for 30 min before it was resuspended and diluted to 1 mM in hexafluoro-2-propanol. After evaporation, peptide films were dried in a Speed vacuum and stored at –40 °C. Peptide films were resuspended to 5 mM in dimethyl sulfoxide (DMSO) for 10 min. To form the ADDLs (32), we diluted the 5 mM DMSO solution to 100 μ M in cold PBS, vortexed for 30 s, and incubated overnight at 4 °C. Before use, the A β /PBS solution was further diluted in culture media. The presence of ADDLs was tested by Western blots using 6E10 (data not shown).

To form the monomers, immediately before use, we diluted the 5 mM DMSO solution in PBS (to a final concentration of 100 μ M), following by ultrafiltration through 5-kDa cutoff device (Vivaspin 2, Sartorius Biolab Products). The presence of the monomeric A β 42 peptide (4.5 kDa) was verified by Western blots (data not shown).

Soluble Protein Extraction (Soluble Fractions) and Immunoprecipitation—The soluble fractions were obtained by ultracentrifugation of the homogenates as described previously (26, 33). Briefly, tissue samples were homogenized (using a Dounce homogenizer) in cold isotonic buffer (0.32 M sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing a mixture of protease and phosphatase inhibitors, Sigma) and ultracentrifuged (Optima™ MAX Preparative Ultracentrifuge, Beckman Coulter) at 120,000 \times g, 4 °C, during 60 min. Immediately after centrifugation, the samples were aliquoted and stored at –81 °C until use. The protein content in the soluble fractions was determined by Lowry. To diminish the potential inter-individual variability, the S1 fractions from four different mice, for each age and genotype, were pooled.

For immunoprecipitation experiments, 50 μ g of soluble proteins were incubated, overnight at 4 °C with continuous shaking, with A11 antibody, previously adsorbed to protein G-Sepharose or protein A-Sepharose beads (Sigma) (2 μ g of purified antibody/20 μ g of protein G- or A-Sepharose) in the presence of protease inhibitors (Roche Applied Science) in a final volume of 500 μ l of TBS. Immunobeads were isolated by centrifugation and washed three times in cold TBS. Finally, the immunoprecipitated proteins were eluted using 20 μ l of Laemmli's buffer and analyzed by Western blots.

For *in vitro* experiments, the soluble fractions from the different mice and ages were thawed immediately before use, diluted with DMEM (without FBS), sterilized by filtration

(through 0.22- μ m filters, Millipore), and added to cell cultures. For each experiment, duplicate wells were stimulated under the same experimental conditions.

The immunodepletion experiments were done basically as described previously (26, 34). Briefly, 50 μ g of protein from soluble fractions from 6- and 18-month-old PS1 \times APP mice ($n = 3$ /age) were subjected to three sequential incubations (8–12 h at 4 °C) with either 6E10 (5 μ g) protein G-Sepharose or A11 (5 μ g) protein A-Sepharose immunocomplexes. After immunodepletion, the soluble fractions were used for *in vitro* stimulation (see below). As control, the different soluble fractions were sequentially incubated with either protein G-Sepharose or protein A-Sepharose and tested, in parallel experiments, with the immunodepleted samples.

Western Blot and Dot Blot—Western blots were performed as described previously (34). Briefly, 10–20 μ g of protein from the different samples were loaded on 16% SDS-Tris-Tricine-PAGE and transferred to nitrocellulose (Hybond-C Extra, Amersham Biosciences). Alternatively, the immunoprecipitated samples were electrophoresed on 12% SDS-Tris glycine.

After blocking, the membranes were incubated overnight, at 4 °C, with the appropriate antibody. The membranes were then incubated with anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Dako, Denmark) at a dilution of 1:8000. The blots were developed using the ECL-plus detection method (Amersham Biosciences).

Dot blots were done as described previously (26, 34). One μ g of protein from the different soluble fractions were directly applied to dry nitrocellulose in a final volume of 2 μ l. Blots were air-dried, blocked for 1 h, and incubated overnight at 4 °C, with either Nu-1 (courtesy of Dr. W. Klein; 1 μ g/ml) or A11 (1:5000 dilution, BIOSOURCE) antibodies. After the incubation, the blots were washed and visualized as described above.

For quantification, the scanned (Epson 3200) images were analyzed using the PCBAS program. In each experiment, the intensity of bands from WT mice and/or experimental conditions were averaged and considered as 1 relative unit. Data were always normalized by the specific signal observed in 6-month-old WT group or negative control for “*in vitro*” experiments.

Tissue Preparation—After deep anesthesia with sodium pentobarbital (60 mg/kg), 6- and 18-month-old control (WT) and PS1 \times APP tg male mice ($n = 4$ /age/genotype) were perfused transcardially with 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, followed by 4% paraformaldehyde, 75 mM lysine, 10 mM sodium metaperiodate in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. Brains were then removed, post-fixed overnight in the same fixative at 4 °C, cryoprotected in 30% sucrose, sectioned at 40 μ m thickness in the coronal plane on a freezing microtome, and serially collected in wells containing cold PBS and 0.02% sodium azide. All animal experiments were approved by the Committee of Animal Use for Research of the Malaga University (Spain) and the European Union Regulations.

Immunohistochemistry—Coronal free-floating brain sections (40 μ m thick) from 6- and 18-month-old control (WT) and PS1 \times APP mice were processed simultaneously for phospho-GSK-3 β immunolabeling in the same solutions and conditions to prevent processing variables. Sections were first treated with 3% H₂O₂, 3% methanol in PBS and with

avidin-biotin blocking kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) and then incubated overnight at room temperature with rabbit anti-GSK-3 β (phospho-Ser-9) antibody (dilution 1:100, Abcam ab30619).

The tissue-bound primary antibody was detected by incubating with the corresponding biotinylated secondary antibody (1:500 dilution, Vector Laboratories) and then followed by streptavidin-conjugated peroxidase (Sigma) diluted 1:2000. The reaction was visualized with 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma), 0.03% nickel ammonium sulfate, and 0.01% hydrogen peroxide in PBS. Sections were then mounted on gelatin-coated slides, air-dried, dehydrated in graded ethanols, cleared in xylene, and coverslipped with DPX (BDH) mounting medium. Specificity of the immune reaction was controlled by omitting the primary antiserum.

N2a and Primary Neuronal Cultures—N2a cells were plated at 25,000 cells/cm² and cultured in high glucose DMEM/OptiMEM (50–50%) supplemented with 2 mM glutamine and 5% fetal bovine serum (PPA Co.) in the presence of penicillin and streptomycin (100 units/ml and 0.01 mg/ml, respectively). For stimulation experiments, the medium was changed to high glucose DMEM and serum-deprived for 12 h. The cells were stimulated using 5% fetal bovine serum, 100 nM IGF-1 (Sigma), 100 nM insulin (Sigma), 10 nM NGF- β (Sigma), or 25 nM sAPP α (Sigma) in the presence or absence of ADDLs (ranging from 0.01 to 2 μ M; estimated from the initial A β 42 concentration used for oligomerization; we are aware that the ADDL concentration could be underestimated). After stimulation, the proteins were isolated and analyzed as described above.

Primary neuronal cultures were done essentially as described previously (27). Briefly, embryonic E18–20 or postnatal P1 brains were dissected and treated, for 5 min, with trypsin/DMEM/EDTA medium (BioWhittaker, Cambrex, Belgium). The treatment was stopped using complete DMEM plus 10% FBS, and the cells were mechanically dissociated. After mechanical dissociation, the debris was eliminated by filtration (40 μ m, Falcon), and the cells were seeded (at a density of 60,000 cells/ml) in Neurobasal medium plus B27 supplemental (containing glutamine, 1% penicillin/streptomycin and gentamycin) on poly-D-lysine (Sigma)-treated Nunc 12- or 96-well plates. The cells were cultured at 37 °C, in humidified 5% CO₂, 95% atmosphere. Medium was half-replaced every 4 days. After 13–15 days in culture, the cultures were treated with different concentrations (ranging from 0.01 to 2 μ M) of ADDLs (prepared as described above) or different concentrations (ranging from 0.27 to 54 nM) of sAPP α . The cells were then incubated for 30 min and rinsed with cold PBS, and the proteins were extracted as above. The neuronal survival was assayed using MTS (Promega) following the manufacturer's indications.

Statistical Analysis—Data were expressed as means \pm S.D. The comparison between two mouse groups (WT and PS1 \times APP tg mice) was done by two-tailed *t* test. For comparison between several age groups, we used one-way analysis of variance followed by Tukey post hoc multiple comparisons test (Statgraphics plus 3.1). The significance was set at 95% of confidence.

RESULTS

Age-dependent Modifications on the GSK-3 β Activity in PS1 \times APP Mouse Hippocampus—The GSK-3 β activity could play a central role controlling apoptosis and the development of Alzheimer disease. Because GSK-3 β activity was inhibited by phosphorylation on Ser-9, we have first quantified, by Western blots, the Ser-9 phospho-GSK-3 β levels in our PS1 \times APP tg model. We used two different ages, 6 and 18 months, before and after pyramidal neurodegeneration, respectively (26, 30). Western blot analysis demonstrated the existence of a clear age-dependent variation of the Ser-9 phosphorylation levels in PS1 \times APP mice (Fig. 1A, panels a1 and a2). As compared with 6-month-old WT mice, the levels of Ser-9 phospho-GSK-3 β were elevated in young PS1 \times APP hippocampus, whereas the 18-month-old PS1 \times APP mice displayed a significant decrease. In fact, the Ser-9 phosphorylation level, at 18 months, represented a decrease of 5.66 ± 0.46 times over 6-month-old PS1 \times APP mice. This observation was also confirmed using immunohistochemistry. As shown in Fig. 1B, the phospho-Ser-9 GSK-3 β immunoreactivity was mainly located in the somata of hippocampal neuronal cells. As also shown (Fig. 1B, panels b1 and b2), a marked increase in the immunoreactivity was observed in the hippocampus of 6-month-old PS1 \times APP tg mice, as compared with WT. This increase was evident in both pyramidal and interneuronal cell somata and their proximal dendrites. In parallel experiments, GSK-3 β phosphorylation immunostaining was clearly decreased in aged PS1 \times APP tg mice (Fig. 1B, panels b3 and b4).

The GSK-3 β activity could modulate the intrinsic apoptotic pathway by modifying, directly and/or indirectly, the expression of pro- and anti-apoptotic Bcl-2 family proteins (35–37). Thus, we have determined the possible variations in the expression of mRNAs coding for Bcl-2 proteins in 6- and 18-month-old WT and PS1 \times APP tg mice. According to the phosphorylation of the GSK-3 β (38), in 6-month-old PS1 \times APP mice the expression of *bcl-2* was increased (Fig. 1C). On the contrary, in 18-month-old PS1 \times APP animals, the expression of *bcl-2* was not different from WT, whereas *bim* and *bad* expression increased exclusively in transgenic animals. These data could indirectly reflect the activation of GSK-3 β in aged PS1 \times APP mice. Additionally, the possible age-dependent activation of the GSK-3 β was also tested by determining the protein level and phosphorylation status of β -catenin (39). Although the phosphorylated *versus* total β -catenin ratio was not altered in 6-month-old PS1 \times APP mice (Fig. 1D), we did observe an increase in the steady-state levels of both β -catenin forms. These data were consistent with a reduced GSK-3 β activity. More relevant and also consistent with the proposed age-dependent increase in the GSK-3 β activity, the total and phosphorylated β -catenin contents were dramatically reduced in 18-month-old PS1 \times APP mice (Fig. 1D). Furthermore, the ratio of phospho/total β -catenin displayed a considerable increase in these aged PS1 \times APP mice, suggesting a hyperphosphorylation status of the β -catenin.

These data demonstrated the existence of an age-dependent change in the phosphorylation of the GSK-3 β in our PS1 \times APP tg model. Whereas at early ages the GSK-3 β seemed to be

A β Oligomers Reverse Neuroprotective Effect of sAPP α

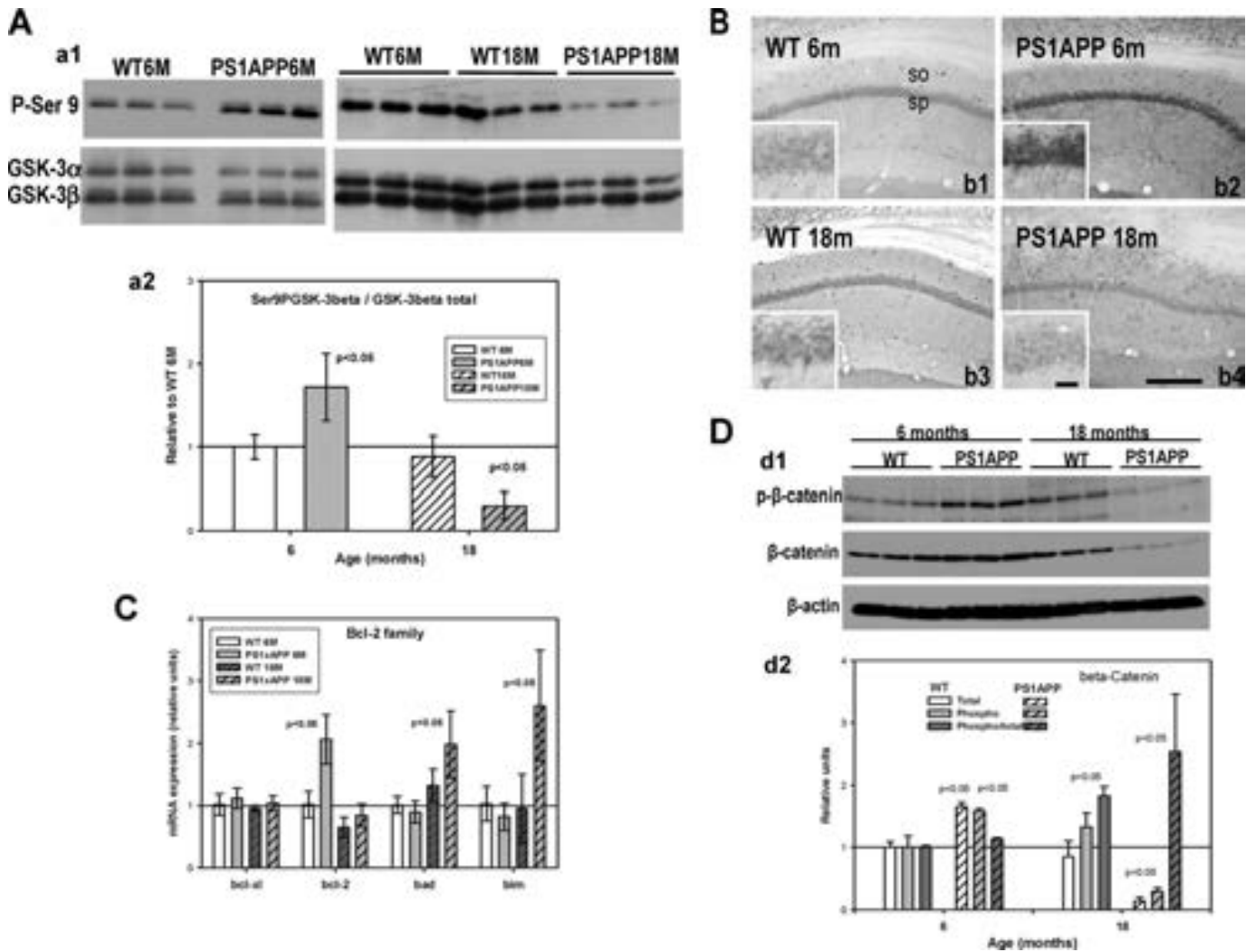


FIGURE 1. Age-dependent decrease on GSK-3 β phosphorylation (Ser-9) in PS1 \times APP hippocampus. *A*, relative phosphorylation levels of Ser-9 GSK-3 β (panel a1, upper panel) were determined, by Western blots, in 6- and 18-month-old WT and PS1 \times APP hippocampi. The Western blots were then reprobbed for total GSK-3 β (a1, lower panel). In these experiments, 10 μ g of proteins from WT and PS1 \times APP mice were electrophoresed in parallel, using different distributions. In each gel, a minimum of three WT and three PS1 \times APP samples were run together. The experiment was repeated three times using different sample combinations. Quantitative analysis of the Western blots is shown in panel a2. The Western blots were scanned, and the ratio between phosphorylated/total expression was calculated. In each experiment, the phosphorylation/total ratio was normalized by 6-month-old WT value. The total protein loading was also tested by anti- β -actin antibody (data not shown). *B*, hippocampal (CA1) light microscopy images of phospho-Ser-9-GSK-3 β immunohistochemistry from 6- and 18-month-old WT and PS1 \times APP brains were processed in parallel. Thus, both WT and PS1 \times APP slices were equally developed. The image shown is representative of four different WT and PS1 \times APP mice. *Insets* show higher magnifications of stratum pyramidale. *C*, expression of different *bcl-2* family protein mRNAs was analyzed by quantitative RT-PCR. In each case, the results ($n = 7$) were corrected by the GAPDH expression and normalized by 6-month-old WT mice. *D*, total and phosphorylated β -catenin levels were assessed by Western blots (panel d1). Quantitative data are shown in panel d2. As shown, the total and phosphorylated β -catenin increased in samples from 6-month-old PS1 \times APP, and there was a dramatic decrease in both levels in samples from 18-month-old PS1 \times APP mice. Furthermore, the phosphorylated/total ratio also increased at this old age. Significance difference between the different samples was determined by analysis of variance followed by Tukey test. *so*, stratum oriens; *sp*, stratum pyramidale. *Scale bars*, 50 μ m.

inhibited by Ser-9 phosphorylation (probably exerting a neuroprotective action), in aged PS1 \times APP mice the activation of GSK-3 β was increased.

Young and Aged PS1 \times APP Hippocampus-derived Soluble Factors Increased or Inhibited, Respectively, the Akt-dependent Phosphorylation of GSK-3 β —We next investigated the possibility that soluble APP-derived factors were involved in the modulation of GSK-3 β phosphorylation in both young (6 months) and aged (18 months) PS1 \times APP mice. In this sense, it has been recently reported that monomeric A β 42 mediated the activation of the PI3K-Akt pathway (40), whereas A β oligomers (ADDLs) induced an impairment of insulin receptors (27).

We have first determined *in vitro* using N2a cell cultures the effect of soluble brain extracts, derived from 6- and 18-month-old WT, PS1 (data not shown), and PS1 \times APP mice on the Ser-9 phosphorylation of GSK-3 β . As shown (Fig. 2A, and quantitatively in Fig. 2C), the addition of the soluble fractions obtained from 6-month-old PS1 \times APP mice produced a clear induction in the GSK-3 β phosphorylation over basal values (serum deprivation). This increase was mediated by the activation of the PI3K/Akt pathway because Akt was phosphorylated at both Thr-308 and Ser-473 residues (Fig. 2A), and the effect was abolished by the addition of LY294002 (data not shown). This activation of the PI3K/Akt pathway seemed to be mediated by at

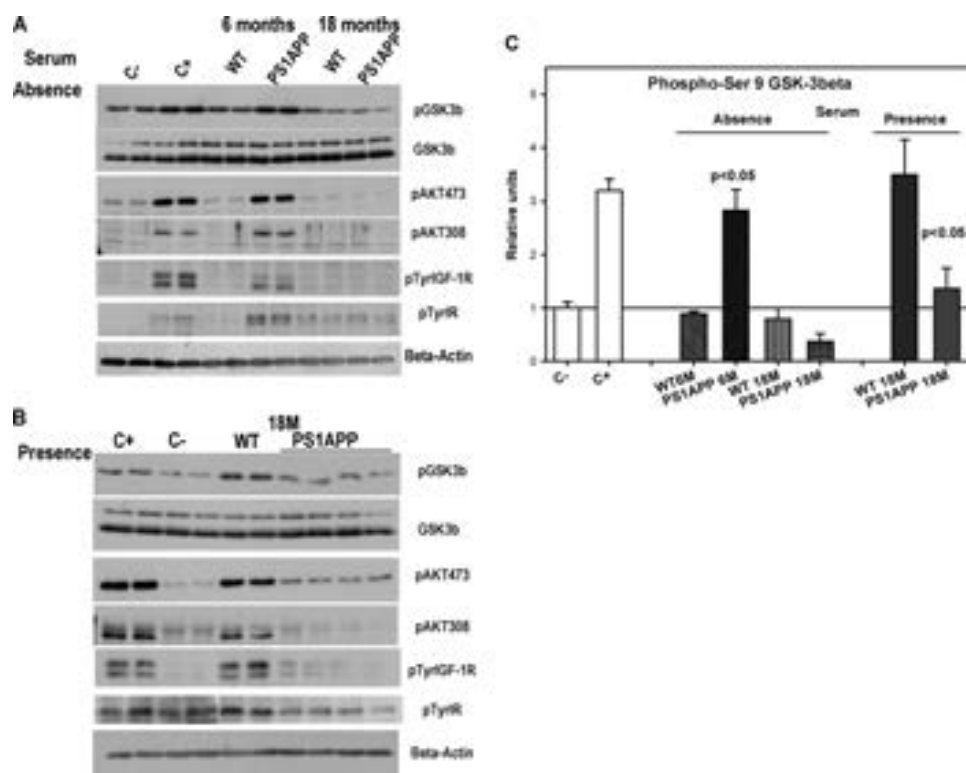


FIGURE 2. Soluble fractions, derived from 6- or 18-month-old PS1 \times APP mice, produced the stimulation or inhibition of Akt-GSK-3 β phosphorylation. A, N2a cultures were serum-deprived for 12 h and treated with 50 μ g of soluble proteins derived from young (6 months) or old (18 months) WT and PS1 \times APP mice. After treatment, the phosphorylation levels of GSK-3 β (Ser-9), Akt (Ser-473 or Thr-308), IGF-1R (phospho-Tyr-1135/1136), or IR (phospho-Tyr-1150/1151) were determined by Western blots. As shown, the S1 fractions from 6-month-old PS1 \times APP produced a clear induction of the phosphorylation levels of all protein tested. B, possible inhibitory effect of 18-month-old PS1 \times APP S1 fractions (50 μ g of protein) was assessed in serum-stimulated Akt-GSK-3 β pathways. For each condition, two culture wells were treated in parallel, and the experiments were repeated at least three times. C, quantitative analysis of experiments shown in A and B. The results are mean \pm S.D. of three independent experiments. Data were normalized by negative controls (C-). Negative (C-) and positive (C+) controls represented control experiments in the absence (12 h) or presence of serum, respectively. The protein loading was tested by total GSK-3 and β -actin.

least the IGF-1 and/or insulin receptors. In fact, both receptors were activated (Tyr-phosphorylated) in the presence of these soluble extracts. The activation of the Akt and phosphorylation of GSK-3 β were specific for the factors present in PS1 \times APP mice because the addition of a similar amount of soluble proteins from WT or PS1 transgenic mice (data not shown) was devoid of any effect.

In parallel experiments, we have also tested the effect of soluble extracts from 18-month-old PS1 \times APP mice (Fig. 2, A and C). In contrast to that observed using young PS1 \times APP, 18-month-derived soluble fraction did not induce the phosphorylation of Akt-GSK-3 β in serum-deprived cultures. In fact, a small inhibition, over control values, was observed (Fig. 2C). The soluble extracts from 18-month-old WT mice displayed no intrinsic effect.

The possible inhibitory action of the soluble fractions from aged transgenic mice was tested by analyzing their effect on the serum-stimulated Akt-GSK-3 β phosphorylation. As shown (Fig. 2B), the treatment of N2a cells with fractions derived from 18-month-old PS1 \times APP mice produced a practically complete inhibition of the serum-induced GSK-3 β phosphorylation (see also Fig. 2C). This inhibition was paralleled by a decrease in Akt473 and Akt308 phosphorylation and was also paralleled by a decrease in the Tyr phosphorylation of IGF-1R and insulin receptor. The soluble fractions from aged WT or PS1 (data not shown) mice showed no apparent effect.

In addition, we have also examined the effect of 6- and 18-month-derived soluble fractions on neuronal survival assays. For these experiments, primary neurons were subjected to deprivation and supplemented with 6- or 18-month soluble fractions. As expected (see supplemental Fig. 1), the soluble extract from 6-month-old PS1 \times APP avoided the decrease in neuronal survival due to growth factor deprivation. As also expected, the soluble fraction from 18 months did not protect or even produce a small decrease on the neuronal survival. In this sense, we also tested the possible neurotoxic effect of these 18-month PS1 \times APP-soluble fractions. After 24 h of incubation, in the presence of B27 supplement, these soluble fractions produced a significant decrease in the neuronal survival ($100.0 \pm 7.7\%$ versus $80.19 \pm 2.6\%$, $n = 3$; $p < 0.05$). The WT-derived soluble fractions displayed no intrinsic effect. These data demonstrated that soluble factors present exclusively in PS1 \times APP-derived brain fractions modulated (positively or negatively) the GSK-3 β phosphorylation and neuronal survival.

Characterization of APP-derived Fragments from Young and Aged PS1 \times APP Mice—As mentioned above, APP-derived proteins could modulate the GSK-3 β phosphorylation. In consequence, we have next analyzed, by Western blots using the mAb 6E10 (Fig. 3A), the presence of APP-derived soluble fragments in these fractions. As shown, the soluble fractions from 6-month-old PS1 \times APP mice exhibited a single specific (as compared with WT) band of high apparent molecular weight

A β Oligomers Reverse Neuroprotective Effect of sAPP α

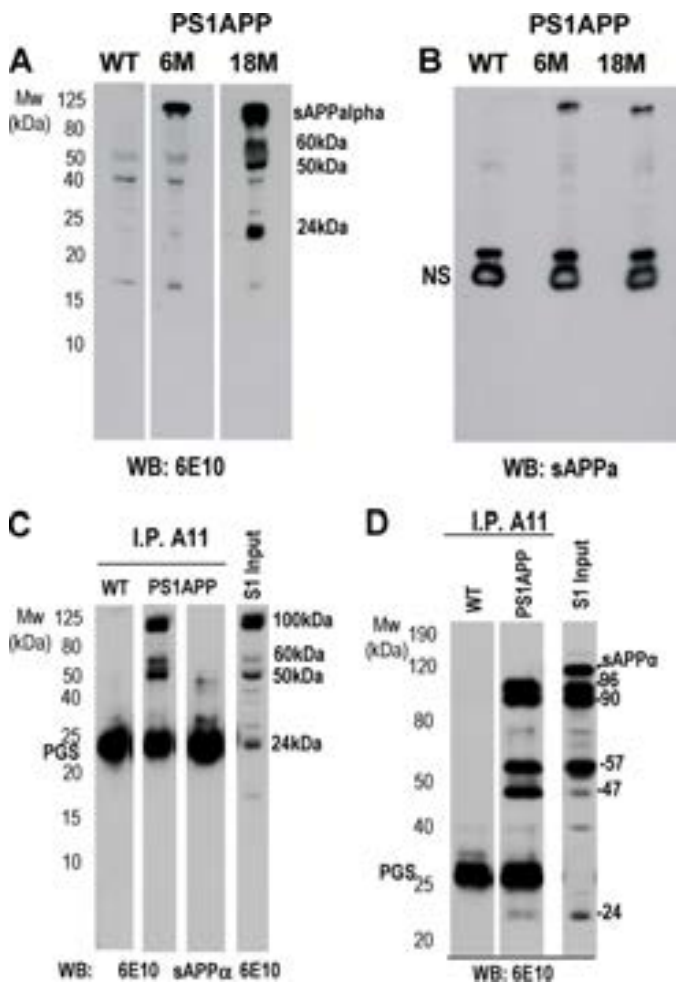


FIGURE 3. A β oligomeric forms in soluble extracts from 18-month PS1 \times APP. *A*, S1 fractions from 6 month-old WT and PS1 \times APP or 18-month PS1 \times APP were first analyzed by Western blot (16% SDS-Tris-Tricine-PAGE) using mAb 6E10. Results showed an age-dependent increase of soluble SDS-resistant oligomeric species of approximately 24, 50, 60, and 90 kDa in PS1 \times APP animals. No significant amounts of mono-, di-, or trimers were detected under these experimental conditions. *B*, Western blots (WB) were re-tested using anti-sAPP α antibody. Only a high molecular weight specific band (~90 kDa) was observed. No significant (NS) age-dependent changes could be appreciated in this band. *C*, immunoprecipitation (I.P.) experiments using A11 antibody were addressed for selective recognition of the A β oligomers in 18-month PS1 \times APP-soluble extracts. The S1 fractions obtained from 18-month-old WT or PS1 \times APP were incubated with A11-protein G-Sepharose immunocomplexes and analyzed by 16% SDS-Tris-Tricine-PAGE and Western blots using 6E10. As shown, the pattern of immunisolated A β oligomers was similar to that observed in the crude S1 fraction. Anti-sAPP α antibody displayed no specific staining in these immunoprecipitated samples. *D*, A11 immunisolated oligomers were resolved using 12%-SDS-Tris glycine-PAGE and blotted as in *C*. Using this approach, at least five different A β oligomeric forms were identified. Western blots are representative of at least four replicated experiments with similar results.

(Fig. 3A). Interestingly, no monomeric A β was detected by this assay, even after longer exposures (data not shown). Because mAb 6E10 recognized both A β peptides and sAPP α , we retested the Western blots using an anti-sAPP α antibody. As shown (Fig. 3B), a band of similar relative molecular weight (M_r) was also observed with this antibody. Therefore, sAPP α was the predominant APP-derived fragment (detected with 6E10) in young PS1 \times APP mouse hippocampi.

However, the analysis of the soluble fractions from 18-month-old PS1 \times APP mouse hippocampi demonstrated the

presence of several oligomeric A β forms. Based on the calculated M_r (24, 50, and 60–70 kDa), these A β oligomers were compatible with the presence of 6- and 12–16-mer, SDS-resistant aggregates. As expected, these oligomers were immunopositive for A11 and Nu-1 antibodies in dot blots (data not shown but see Ref. 26). It is also interesting the absence of monomeric A β in these fractions. It is of note that the presence of a relatively abundant band localized in the high molecular weight range. This band probably corresponded to a different highly aggregated A β oligomer because, as probed by Western blots using anti-sAPP α antibody, this soluble fragment did not increase in aged PS1 \times APP mice (see Fig. 2B).

To further characterize these A β oligomers, we used the conformation-dependent anti-oligomeric A11 antibody in immunoprecipitation assays. As shown (Fig. 3C), three different high molecular weight A β oligomers (50, 60–70, and 90–100 kDa) were immunoprecipitated by A11 antibody. The 24-kDa oligomer was occluded by the presence of a prominent band corresponding to the protein G-Sepharose. This putative 6-mer oligomer was clearly visualized using A11-protein A-Sepharose immunocomplexes (data not shown but see below). Furthermore, as expected, A11 antibody did not immunoprecipitate the sAPP α (Fig. 3C).

To better resolve these relatively high molecular weight A β oligomers, the A11-immunoprecipitated proteins were also analyzed in 12% Tris glycine gels (Fig. 3D). As shown, at least five different putative A β oligomers (detected by 6E10) of 24, 47, 57, 90, and 96 kDa were identified in these experiments. As also shown, the sAPP α (110-kDa band), present in the soluble fraction, was not immunoprecipitated by A11. Therefore, the aggregated forms presented in the soluble fractions from 18-month-old PS1 \times APP mice were compatible with the presence of A β oligomers of 6-, 10-, 12-, 20- and 22-mers.

Opposite Actions of Synthetic sAPP α (Stimulation) and ADDLs (Inhibition) on the Akt Prosurvival Pathway—Based on the observed soluble fraction composition, we next characterized the effect of synthetic sAPP α and A β oligomers on the Akt-GSK-3 β phosphorylation (Fig. 4) using N2a cell cultures.

The soluble APP α (Fig. 4A, panel a1, and quantitatively in panel a2) produced a dose-dependent increase in the phosphorylation levels of Ser-9 GSK-3 β and Akt (at Thr-308 and Ser-473 residues), whereas the soluble APP β , probed in parallel experiments, produced no effect in this *in vitro* phosphorylation assay (Fig. 4A, panel a2). Interestingly, the sAPP α displayed a quite high potency in the low nanomolar range ($EC_{50} = 2.30 \pm 0.93$ nM, $n = 4$; Fig. 4A, panel a2) coincident with the estimated concentration (by Western blots using commercial sAPP α as standard) of the sAPP α in the soluble fraction of the 6-month-old PS1 \times APP mice (19.9 ± 4.11 nM). This stimulatory effect was also replicated using primary cortical cultures (supplemental Fig. 3A). As expected, sAPP α seemed to exert its effect acting through IGF-1R and insulin receptor (see Fig. 4A, panel a1) and, in consequence, was inhibited by LY294002, AG1024, and picropodophyllin (supplemental Fig. 2A).

These data indicated that in this *in vitro* model the sAPP α behaved like an agonist, acting at least through IGF-1R and insulin receptors, activating the PI3K/Akt pathway and, in consequence, phosphorylating and inhibiting the GSK-3 β activity.

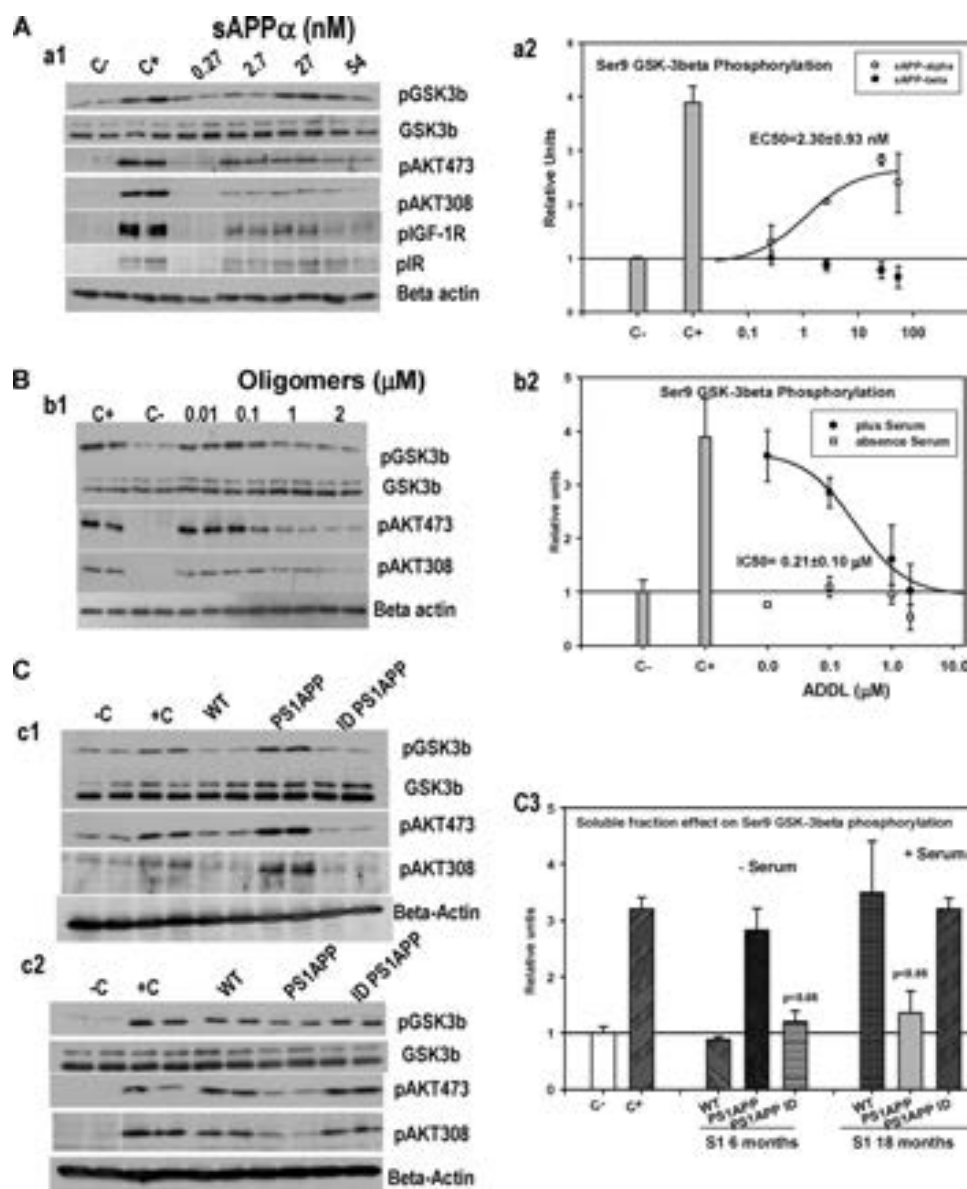


FIGURE 4. Synthetic sAPP α and A β oligomers (ADDLs) stimulated or inhibited the Akt-GSK-3 β phosphorylation in N2a cultures. *A*, sAPP α activated the IGF-1R/IR Akt GSK-3 β pathway. Serum-deprived N2a cultures were treated with increasing concentrations of synthetic sAPP α or sAPP β (data not shown), and the phosphorylations of Ser-9 GSK-3 β , Akt (473 and 308), IGF-1R (Tyr-1135/1136), and IR (Tyr-1150/1151) were analyzed by Western blots (*panel a1*). *Panel a2*, quantitative analysis of Western blots normalized by negative control (C-). *B*, inhibitory effect of increased concentrations of ADDLs on Akt-GSK-3 β phosphorylation was assessed in N2a maintained in the presence of serum. Western blots (*panel b1*) and quantitative analysis of the data (*panel b2*) are illustrated. *C*, immunodepletion experiments. The S1 fractions, derived from 6- (*panel c1*) or 18-month-old (*panel c2*) PS1 \times APP mice, were immunodepleted using 6E10 or A11, and the samples were tested for stimulation experiments (as above) in the absence (*panel c1*) or presence of serum (*panel c2*). *Panel c3*, quantitative analysis of the Western blots. Data were normalized by the corresponding negative control and are means \pm S.D. of three independent experiments. Data (mean \pm S.D.) presented in *panels a2* and *b2* were fitted to a logistic four-parameter equation as described previously (34, 62). The protein loading was tested by total GSK-3 β and β -actin.

In addition, saturating concentrations of sAPP α promoted neuronal survival in a deprivation assay ([supplemental Fig. 2B](#)).

Aiming to test the possible inhibitory effect of oligomeric A β , we have used synthetic A β oligomers (ADDLs) (41). Similar to natural A β oligomers, the synthetic ADDLs displayed no intrinsic effect in the absence of serum (data not shown). Also similar to natural oligomers, in the presence of serum, ADDLs displayed a dose-dependent inhibition of the GSK-3 β phosphorylation (Fig. 4*B*, *panel b1*) with a calculated IC₅₀ of 0.21 \pm 0.10 μ M ($n = 4$) (Fig. 4*B*, *panel b2*). As expected from our previous data, this inhibitory effect was paralleled by an inhibition

of the serum-stimulated Akt activation (pAkt473 and -308) (Fig. 4*B*, *panel b1*). This inhibitory effect was also replicated in primary neuronal cultures ([supplemental Fig. 3B](#)).

In addition, we have tested the possible neuroprotective effect of sAPP α and 6-month PS1 \times APP-soluble fractions on ADDL (2 μ M) toxicity ([supplemental Fig. 3C](#)). As shown, the sAPP α and 6-month PS1 \times APP soluble fractions avoided (partially and fully, respectively) the ADDL-induced neuronal toxicity.

Based on these observations, we postulated that if the stimulation (at 6 months) or inhibition (18 months) of the Akt-

A β Oligomers Reverse Neuroprotective Effect of sAPP α

GSK-3 β phosphorylation was indeed mediated by sAPP α , at 6 months, or A β oligomers, at 18 months, their effect should be avoided by immunodepletion using 6E10 (for sAPP α) or A11 (for A β oligomers). Therefore, we tested the stimulation or inhibition of Akt-GSK-3 β phosphorylation after three sequential immunodepletions of the soluble fractions with either 6E10 (for 6 months) or A11 (18 months). The results are shown in Fig. 4C (and quantitatively in Fig. 4C, *panel c3*). As expected, after immunodepletion with 6E10, the stimulatory action of the 6-month-derived fractions was completely avoided (Fig. 4C, *panel c1*). Neither GSK-3 β nor Akt 473/308 was phosphorylated after 6E10 immunodepletion. Conversely, the inhibitory effect of the 18-month-derived fraction was completely reversed by A11 immunodepletion (Fig. 4C, *panel c2*). As shown, the serum-induced GSK-3 β and Akt473/308 phosphorylation was almost completely re-established after A11 treatment.

Therefore, at young ages in our PS1 \times APP model, the production of sAPP α determined the activation of Akt and the phosphorylation of Ser-9-GSK-3 β (throughout at least IGF-1 and/or insulin receptors), whereas the age-dependent appearance of soluble oligomeric forms of A β determined the inhibition of this pro-survival pathway.

Synthetic A β Oligomers Inhibit the Activation of Prosurvival Receptors—Because of the relevance of the inhibition of the pro-survival pathways in the development of AD, we have further evaluated the inhibitory properties of the oligomeric A β using *in vitro* assays. It has been suggested that A β oligomers could inhibit the prosurvival Akt-GSK-3 β phosphorylation by direct interaction with at least insulin receptors (42) and/or produced insulin resistance (27, 43). To ascertain the possible specificity in the ADDL inhibition, we determined the effect of two different concentrations of ADDLs (0.2 and 2 μ M) on the stimulatory effect of IGF-1, insulin, BDNF, NGF, and sAPP α (Fig. 5A, *panels a1* and *a2*). As expected, the addition of the different factors produced the phosphorylation of the GSK-3 β , demonstrating the presence of functional receptors in the N2a cells. As also shown in Fig. 5A, ADDLs inhibited the induced GSK-3 β phosphorylation for all factors tested. Importantly, the effect of ADDLs displayed a clear selectivity on the inhibitory action. As shown, the NGF stimulation of GSK-3 β phosphorylation seemed to be preferentially inhibited. In fact, 0.2 μ M ADDLs completely blocked the NGF stimulation. In contrast, BDNF stimulation displayed low sensitivity to the ADDL effect. Only a minor inhibition could be observed at the highest dose used (2 μ M). Insulin, IGF-1, and sAPP α presented intermediately sensitivity.

This selectivity could indicate that ADDLs might interact directly with the different trophic receptors. Theoretically, if both ligands exert their action through the same receptor, the ADDL inhibition should be reverted by increasing the trophic factor concentration. In fact, the inhibitory effect of submaximal doses of ADDLs (20 nM) was totally reverted by increasing concentrations of NGF (Fig. 5B, *panels b2* and *b2*). Similar results were observed using IGF-1 or insulin (data not shown). Based on these data, we cannot discriminate between a direct inhibition or a negative allosteric effect of ADDLs. However, these data indicated that the inhibitory action of A β oligomers

was, at least in part, mediated by a direct interaction with different prosurvival receptors. In fact, ADDLs inhibited the Tyr phosphorylation of IGF-1, insulin, and Trk-A receptors ([supplemental Fig. 4](#)). The results indicated that for all three receptors the addition of ADDLs prevented the Tyr phosphorylation and, consequently, the receptor activation. This effect was particularly evident for IGF-1R. Therefore, the ADDLs seemed to be acting primordially at the activation level of the different receptors tested.

DISCUSSION

Multiple APP-based transgenic mouse models have been developed to evaluate the neurological deficiencies observed in AD. However, none of them displayed all pathological signs of the disease. The most relevant discrepancies between AD and the transgenic models were the absence of Tau phosphorylation and late, if any, neuronal degeneration, even in the presence of large A β accumulation since early ages. This apparent age-dependent neuroprotective/neurodegenerative status has not yet been fully addressed. Here, using *in vivo* and *in vitro* assays, we demonstrated the following. 1) sAPP α acting through IGF-1R and insulin receptors activated the prosurvival PI3K-Akt-GSK-3 β pathway, which might explain the lack of neuronal death in most transgenic models at early/middle ages. 2) The age-dependent increase in soluble A β oligomers blocked the neurotrophin (including sAPP α)-mediated prosurvival pathway, explaining the observed late neuronal vulnerability.

It has been postulated that GSK-3 β activity might exert a central role in the development of AD. GSK-3 β activity was implicated in Tau phosphorylation, APP processing, A β production, and neurodegeneration (15). Overexpression of GSK-3 β in a conditional transgenic model produced Tau hyperphosphorylation and neuronal death (16, 44). Furthermore, pharmacological inhibition of the GSK-3 β activity by lithium decreased A β production and plaque accumulation (45), improved performance in memory tests, preserved the dendritic structure, and reduced the Tau-dependent pathology in AD tg models (46, 47).

Therefore, in this study we have first determined the Ser-9 phosphorylation levels in young/middle (6 months) and aged (18 months) PS1 \times APP mice, before and after pyramidal cell neurodegeneration in hippocampus, respectively (26). Accordingly, with a putative neuroprotective environment at early/middle ages, young PS1 \times APP mice displayed significantly higher levels of neuronal GSK-3 β Ser-9 phosphorylation, suggesting a decreased activity of this enzyme. Also, we have observed an increased expression of the anti-apoptotic Bcl-2 protein (38) and the increase in the β -catenin protein. These data could indicate the presence of increased levels of neurotrophins in this tg model. However, except for IGF-1, which was locally increased around the A β plaques (although its total concentration decreased in 6- and 18-month PS1 \times APP mice, results not shown), none of the growth factors analyzed were modified in our transgenic model (data not shown). On the contrary, we demonstrated that soluble fractions derived from 6-month-old PS1 \times APP, and not from WT or PS1, activated the IGF-1R/IR-Akt pathway, phosphorylated the GSK-3 β , and in

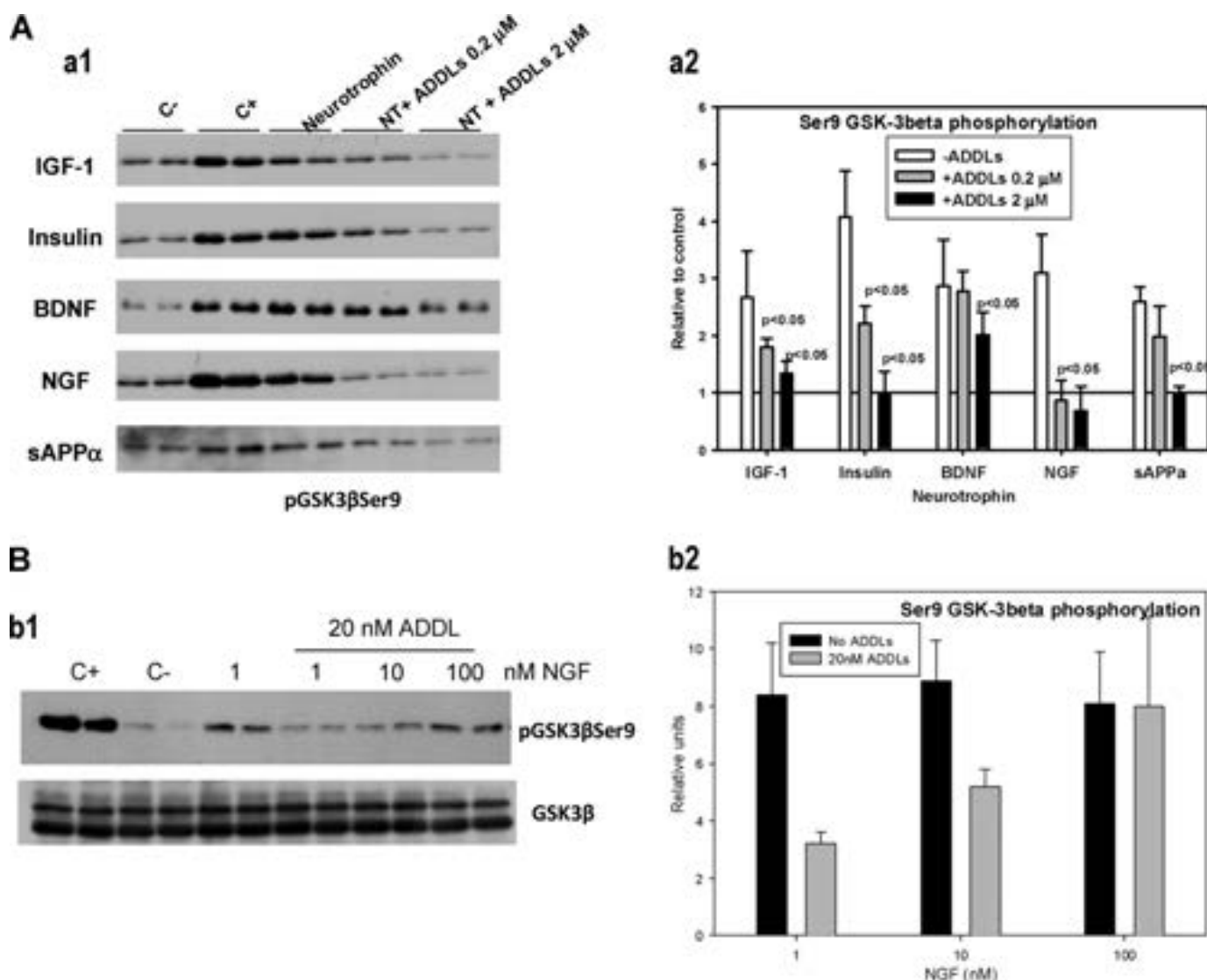


FIGURE 5. Synthetic Aβ oligomers (ADDLs) competed with different neurotrophins for the stimulation of Ser-9 GSK-3β phosphorylation. *A*, for competition experiments, the Ser-9 GSK-3β phosphorylation was stimulated by a fixed concentration of different neurotrophins and 0.2 or 2 μM ADDLs. After treatment, the Ser-9 GSK-3β phosphorylation was determined by Western blots (*panel a1*) and quantitatively (*panel a2*) after normalization by negative controls. *B*, inhibitory effect of ADDLs, at submaximal doses (20 nM) was reverted by increasing the concentration of different neurotrophins, such as NGF, IGF-1 or insulin. In these experiments, N2a cells were treated with different concentrations of each neurotrophin in the absence (data not shown) or presence (*panel b1*) of ADDLs. After Western blots, the GSK-3β phosphorylation was quantitatively analyzed (*panel b2*) and normalized by negative controls. C⁻, negative control; C⁺, positive control.

consequence, promoted the neuronal survival in primary cultures.

Within the different APP-derived fragments, both soluble APPα and -β (data not shown) were the predominant APP peptides identified in the tg-soluble fractions. Although the monomeric Aβ could also produce a similar effect (data not shown) (40), no significant amounts of monomeric Aβ were detected in 6-month-derived soluble extracts.

The implication of sAPPα in the activation of the Akt pro-survival pathway was further demonstrated *in vitro*, using synthetic sAPPα. The sAPPα produced a dose-dependent activation of the Akt-GSK-3β pathway that was inhibited by LY294002, AG1024, and picropodophyllin and mediated by the activation of, in this *in vitro* assay, IGF-1 and insulin receptors. Moreover, the effect of 6-month-old PS1×APP brain-derived fractions was completely avoided by immunodepletion experi-

ments using 6E10. Furthermore, the estimated sAPPα concentration in the soluble fractions (~20 nM) was in the range of the calculated EC₅₀ for synthetic sAPPα (2.3 nM). Interestingly, the sAPPβ fragment displayed no intrinsic activity in this *in vitro* model. To the best of our knowledge, this is the first time that the effect of sAPPα on Akt-GSK-3β pathway has been directly demonstrated.

The present data cannot demonstrate, *in vivo*, a direct cause-effect relationship between the presence of sAPPα and GSK-3β phosphorylation. However, we might postulate that, in our model, the overexpression of the tg APP produced increased amounts of sAPPα and, because of its agonist-like effect on the prosurvival receptors, could to some extent delay the Aβ pathology. In fact, although the increase in GSK-3β phosphorylation was not observed in all APP-based tg models (48, 49), all models exhibited a considerable delay between the Aβ deposi-

A β Oligomers Reverse Neuroprotective Effect of sAPP α

tion and the appearance of neuronal pathology (if any). Thus, data presented in this work add a new connection between APP metabolism and GSK-3 β regulation that could explain the slow pathological progression, observed in all transgenic models, and also the decrease in tauopathy⁶ and increased survival of some bigenic APP-Tau models (50). Moreover, the activation of the α -secretase activity, with a parallel increase in sAPP α secretion, could constitute a novel therapeutic approach in AD (51).

In addition, we have also demonstrated the inhibitory effect of natural oligomeric forms of A β on the Akt-GSK-3 β pathway. It should be noted the presence of five different soluble, SDS-resistant A β oligomers of 24, 47, 57, 90, and 96 kDa in the 18-month PS1 \times APP brain-derived fractions. The identity of these A β oligomeric peptides was confirmed using the polyclonal anti-oligomeric antibody A11 in immunoprecipitation experiments, followed by Western blots using 6E10. These results confirmed our previous data using this tg model (26 and also see Refs. 20, 23).

We observed a clear inhibition of Akt phosphorylation when N2a cells were treated with soluble fractions derived from 18-month-old PS1 \times APP tg mice (see also Ref. 52). This inhibition seemed to be mediated by a direct effect on trophic receptors because activation (Tyr phosphorylation) of at least IGF-1 and insulin receptors was inhibited by the addition of these soluble fractions. Furthermore, this inhibitory effect was exclusively due to the presence of A β oligomers, because the immunodepletion of A β oligomers, using A11, completely reversed the inhibitory effect. Thus, the age-dependent appearance of extracellular A β oligomers could inhibit the Akt-GSK-3 β pro-survival pathway. This inhibitory effect was consistent with the age-dependent decrease in the Ser-9-GSK-3 β phosphorylation, the increase in phosphorylated Tau (results not shown), and the β -catenin hyperphosphorylation and degradation observed in hippocampal samples from 18-month-old PS1 \times APP mice. In addition, as we recently reported, the presence of extracellular A β oligomers determined the potential cytotoxic microglial activation, coincidentally with CA1 pyramidal cell loss (26). Those data, together with the present observations, demonstrated that accumulation of extracellular A β oligomers determined the inhibition of the pro-survival pathways coincidentally with the activation of a potentially cytotoxic inflammatory response. Both actions could indeed create the appropriate environment to induce the observed neuronal death.

Our data also indicated that ADDLs could exert their inhibitory action by a direct effect on the different trophic receptors. This assessment was based on the following: (i) the higher ADDL selectivity for NGF than for BDNF, and (ii) the reversion of the inhibitory effect by increasing concentrations of the neurotrophin (NGF, insulin, or IGF-1). A possible direct effect of A β oligomers and IR has been also suggested previously (27, 42). However, we cannot discard that ADDLs might also exert an inhibitory action by a different mechanism. In this sense, it has been suggested that ADDLs, acting on other different receptors such as N-methyl-D-aspartic acid or p75NTR (53–55), could reduce or even inhibit the insulin response (27, 43)

through Akt473 phosphorylation with no activation of the pathway. However, in our *in vitro* system, the phosphorylation of Akt473 always paralleled Akt308 and GSK-3 β Ser-9, even using primary neuronal cultures (data not shown). We do not know the origin of this disagreement; however, in our *in vitro* assays, the cells were incubated with ADDLs for a short time (20–30 min) in order to minimize the possible cellular death. Thus, it is possible that longer ADDL treatment was required.

Concerning the possible physiological relevance of our observations, it should be mentioned that chronic decrease in the trophic signaling, such as NGF, could be implicated in AD development (7, 56, 57). In this sense, the selective inhibitory effect of A β oligomers (NGF > IGF-1 = insulin > BDNF) might contribute to this decreased signal and, in consequence, be implicated in the preferential vulnerability of the cholinergic system observed in AD. It has also been demonstrated that A β oligomers could directly bind to p75NTR (55, 58) producing the formation of neuritic dystrophies (also observed in our model) (30, 59, 60) and the activation of c-Jun kinases mediating cell degeneration (61). Thus, the appearance of A β oligomers could actively decrease the trophic support, interacting with trophic receptors (this work), and/or increase the toxic signaling activating death receptors such as p75NTR.

In summary, our data demonstrated that the presence of soluble factors in PS1 \times APP mice modulated the GSK-3 β Ser-9 phosphorylation. In young tg mice, sAPP α , acting at least through IGF-1R and IR, determined the activation of Akt-GSK-3 β phosphorylation pathway. The activation of this pathway, classically assigned as pro-survival, could influence the limited Tau phosphorylation and neuronal degeneration observed in most tg models. At relatively late ages (18 months), the presence of multiple A β oligomeric forms determined the inhibition of the signal of all neurotrophins tested. The effect of A β oligomers might be mediated by interaction with the different receptors, although a different and more complex action cannot be discarded. This *in vitro* inhibition of the pro-survival signal was also supported with *in vivo* data, demonstrating a decrease in GSK-3 β Ser-9 phosphorylation and an increase in AT100 immunoreactivity. Revealing the pro-survival pathways used by the different vulnerable neuronal subsets will provide further insights into the molecular mechanisms of AD pathogenesis.

Acknowledgments—We thank Drs. W. Klein and M. Lambert for their generous gift of Nu-1 antibody and Dr. I Torres-Aleman for IGF-1 determination.

REFERENCES

1. Haass, C., and Selkoe, D. J. (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 101–112
2. Thoenen, H. (1995) *Science* **270**, 593–598
3. Tropea, D., Kreiman, G., Lyckman, A., Mukherjee, S., Yu, H., Horng, S., and Sur, M. (2006) *Nat. Neurosci.* **9**, 660–668
4. Ernfors, P., and Bramham, C. R. (2003) *Trends Neurosci.* **26**, 171–173
5. Schulte-Herbrüggen, O., Jockers-Scherübl, M. C., and Hellweg, R. (2008) *Curr. Alzheimer Res.* **5**, 38–44
6. Mufson, E. J., Counts, S. E., Perez, S. E., and Ginsberg, S. D. (2008) *Expert Rev. Neurother.* **8**, 1703–1718
7. Capsoni, S., Tiveron, C., Vignone, D., Amato, G., and Cattaneo, A. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 12299–12304

⁶J. Vitorica, unpublished results.

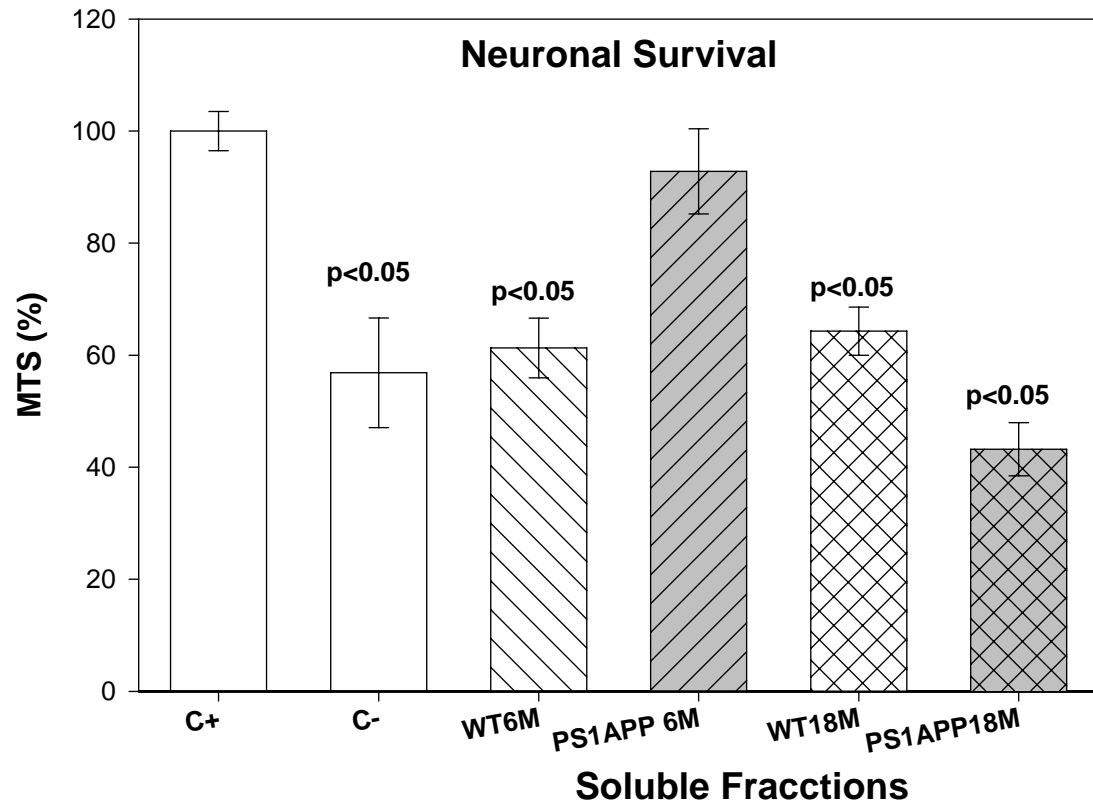
8. Cole, G. M., and Frautschy, S. A. (2007) *Exp. Gerontol.* **42**, 10–21
9. Moloney, A. M., Griffin, R. J., Timmons, S., O'Connor, R., Ravid, R., and O'Neill, C. (2010) *Neurobiol. Aging* **31**, 224–243
10. Hoyer, S. (1998) *J. Neural Transm.* **54**, 187–194
11. Steen, E., Terry, B. M., Rivera, E. J., Cannon, J. L., Neely, T. R., Tavares, R., Xu, X. J., Wands, J. R., and de la Monte, S. M. (2005) *J. Alzheimer Dis.* **7**, 63–80
12. Reger, M. A., Watson, G. S., Green, P. S., Wilkinson, C. W., Baker, L. D., Cholerton, B., Fishel, M. A., Plymate, S. R., Breitner, J. C., DeGroot, W., Mehta, P., and Craft, S. (2008) *Neurology* **70**, 440–448
13. Carro, E., Trejo, J. L., Gomez-Isla, T., LeRoith, D., and Torres-Aleman, I. (2002) *Nat. Med.* **8**, 1390–1397
14. Bondy, C. A., and Cheng, C. M. (2004) *Eur. J. Pharmacol.* **490**, 25–31
15. Balaraman, Y., Limaye, A. R., Levey, A. I., and Srinivasan, S. (2006) *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 1226–1235
16. Lucas, J. J., Hernández, F., Gómez-Ramos, P., Morán, M. A., Hen, R., and Avila, J. (2001) *EMBO J.* **20**, 27–39
17. Peineau, S., Taghibiglou, C., Bradley, C., Wong, T. P., Liu, L., Lu, J., Lo, E., Wu, D., Saule, E., Bouschet, T., Matthews, P., Isaac, J. T., Bortolotto, Z. A., Wang, Y. T., and Collingridge, G. L. (2007) *Neuron* **53**, 703–717
18. Woodgett, J. R., and Ohashi, P. S. (2005) *Nat. Immunol.* **6**, 751–752
19. Beurel, E., and Jope, R. S. (2006) *Prog. Neurobiol.* **79**, 173–189
20. Gong, Y., Chang, L., Viola, K. L., Lacor, P. N., Lambert, M. P., Finch, C. E., Krafft, G. A., and Klein, W. L. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 10417–10422
21. Lacor, P. N., Buniel, M. C., Chang, L., Fernandez, S. J., Gong, Y., Viola, K. L., Lambert, M. P., Velasco, P. T., Bigio, E. H., Finch, C. E., Krafft, G. A., and Klein, W. L. (2004) *J. Neurosci.* **24**, 10191–10200
22. De Felice, F. G., Wu, D., Lambert, M. P., Fernandez, S. J., Velasco, P. T., Lacor, P. N., Bigio, E. H., Jerecic, J., Acton, P. J., Shughrue, P. J., Chen-Dodson, E., Kinney, G. G., and Klein, W. L. (2008) *Neurobiol. Aging* **29**, 1334–1347
23. Lesné, S., Koh, M. T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C. G., Yang, A., Gallagher, M., and Ashe, K. H. (2006) *Nature* **440**, 352–357
24. Shankar, G. M., Bloodgood, B. L., Townsend, M., Walsh, D. M., Selkoe, D. J., and Sabatini, B. L. (2007) *J. Neurosci.* **27**, 2866–2875
25. Deshpande, A., Mina, E., Glabe, C., and Busciglio, J. (2006) *J. Neurosci.* **26**, 6011–6018
26. Jimenez, S., Baglietto-Vargas, D., Caballero, C., Moreno-Gonzalez, I., Torres, M., Sanchez-Varo, R., Ruano, D., Vizuete, M., Gutierrez, A., and Vitorica, J. (2008) *J. Neurosci.* **28**, 11650–11661
27. Zhao, W. Q., De Felice, F. G., Fernandez, S., Chen, H., Lambert, M. P., Quon, M. J., Krafft, G. A., and Klein, W. L. (2008) *FASEB J.* **22**, 246–260
28. Griffin, R. J., Moloney, A., Kelliher, M., Johnston, J. A., Ravid, R., Dockery, P., O'Connor, R., and O'Neill, C. (2005) *J. Neurochem.* **93**, 105–117
29. Blanchard, V., Moussaoui, S., Czech, C., Touchet, N., Bonici, B., Planche, M., Canton, T., Jedidi, I., Gohin, M., Wirths, O., Bayer, T. A., Langui, D., Duyckaerts, C., Tremp, G., and Pradier, L. (2003) *Exp. Neurol.* **184**, 247–263
30. Ramos, B., Baglietto-Vargas, D., del Rio, J. C., Moreno-Gonzalez, I., Santa-Maria, C., Jimenez, S., Caballero, C., Lopez-Tellez, J. F., Khan, Z. U., Ruano, D., Gutierrez, A., and Vitorica, J. (2006) *Neurobiol. Aging* **27**, 1658–1672
31. Caballero, C., Jimenez, S., Moreno-Gonzalez, I., Baglietto-Vargas, D., Sanchez-Varo, R., Gavilan, M. P., Ramos, B., Del Rio, J. C., Vizuete, M., Gutierrez, A., Ruano, D., and Vitorica, J. (2007) *J. Neurosci. Res.* **85**, 787–797
32. Lambert, M. P., Velasco, P. T., Chang, L., Viola, K. L., Fernandez, S., Lacor, P. N., Khuon, D., Gong, Y., Bigio, E. H., Shaw, P., De Felice, F. G., Krafft, G. A., and Klein, W. L. (2007) *J. Neurochem.* **100**, 23–35
33. Kaye, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T. M., Milton, S. C., Cotman, C. W., and Glabe, C. G. (2003) *Science* **300**, 486–489
34. Araujo, F., Tan, S., Ruano, D., Schoemaker, H., Benavides, J., and Vitorica, J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 27902–27911
35. Scali, C., Caraci, F., Gianfriddo, M., Diodato, E., Roncarati, R., Pollio, G., Gavrighi, G., Copani, A., Nicoletti, F., Terstappen, G. C., and Caricasole, A. (2006) *Neurobiol. Dis.* **24**, 254–265
36. Hongisto, V., Smeds, N., Brecht, S., Herdegen, T., Courtney, M. J., and Coffey, E. T. (2003) *Mol. Cell. Biol.* **23**, 6027–6036
37. Lonze, B. E., and Ginty, D. D. (2002) *Neuron* **35**, 605–623
38. Karluski, R., Wilcock, D., Dickey, C., Ronan, V., Gordon, M. N., Zhang, W., Morgan, D., and Tagliatela, G. (2007) *Neurobiol. Dis.* **25**, 179–188
39. Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., and Kemler, R. (1997) *EMBO J.* **16**, 3797–3804
40. Giuffrida, M. L., Caraci, F., Pignataro, B., Cataldo, S., De Bona, P., Bruno, V., Molinaro, G., Pappalardo, G., Messina, A., Palmigiano, A., Garozzo, D., Nicoletti, F., Rizzarelli, E., and Copani, A. (2009) *J. Neurosci.* **29**, 10582–10587
41. Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T. E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K. L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C. E., Krafft, G. A., and Klein, W. L. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 6448–6453
42. Xie, L., Helmerhorst, E., Taddei, K., Plewright, B., van Bronswijk, W., and Martins, R. (2002) *J. Neurosci.* **22**, 221RC
43. Ma, Q. L., Yang, F., Rosario, E. R., Ubeda, O. J., Beech, W., Gant, D. J., Chen, P. P., Hudspeth, B., Chen, C., Zhao, Y., Vinters, H. V., Frautschy, S. A., and Cole, G. M. (2009) *J. Neurosci.* **29**, 9078–9089
44. Engel, T., Hernández, F., Avila, J., and Lucas, J. J. (2006) *J. Neurosci.* **26**, 5083–5090
45. Su, Y., Ryder, J., Li, B., Wu, X., Fox, N., Solenberg, P., Brune, K., Paul, S., Zhou, Y., Liu, F., and Ni, B. (2004) *Biochemistry* **43**, 6899–6908
46. Rockenstein, E., Torrance, M., Adame, A., Mante, M., Bar-on, P., Rose, J. B., Crews, L., and Masliah, E. (2007) *J. Neurosci.* **27**, 1981–1991
47. Noble, W., Planel, E., Zehr, C., Olm, V., Meyerson, J., Suleman, F., Gaynor, K., Wang, L., LaFrancois, J., Feinstein, B., Burns, M., Krishnamurthy, P., Wen, Y., Bhat, R., Lewis, J., Dickson, D., and Duff, K. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 6990–6995
48. Masliah, E., Westland, C. E., Rockenstein, E. M., Abraham, C. R., Mallory, M., Veinberg, I., Sheldon, E., and Mucke, L. (1997) *Neuroscience* **78**, 135–146
49. Malm, T. M., Iivonen, H., Goldsteins, G., Keksa-Goldsteine, V., Ahtoniemi, T., Kanninen, K., Salminen, A., Auriola, S., Van Groen, T., Tanila, H., and Koistinaho, J. (2007) *J. Neurosci.* **27**, 3712–3721
50. Terwel, D., Muyliaert, D., Dewachter, I., Borghgraef, P., Croes, S., Devijver, H., and Van Leuven, F. (2008) *Am. J. Pathol.* **172**, 786–798
51. Kojro, E., Postina, R., Buro, C., Meiringer, C., Gehrig-Burger, K., and Fahrenholz, F. (2006) *FASEB J.* **20**, 512–514
52. Townsend, M., Mehta, T., and Selkoe, D. J. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 33305–33312
53. Zhao, W. Q., Lacor, P. N., Chen, H., Lambert, M. P., Quon, M. J., Krafft, G. A., and Klein, W. L. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 18742–18753
54. Decker, H., Jürgensen, S., Adrover, M. F., Brito-Moreira, J., Bomfim, T. R., Klein, W. L., Epstein, A. L., De Felice, F. G., Jerusalinsky, D., and Ferreira, S. T. (2010) *J. Neurochem.* **115**, 1520–1529
55. Knowles, J. K., Rajadas, J., Nguyen, T. V., Yang, T., LeMieux, M. C., Vander Griend, L., Ishikawa, C., Massa, S. M., Wyss-Coray, T., and Longo, F. M. (2009) *J. Neurosci.* **29**, 10627–10637
56. Capsoni, S., Giannotta, S., and Cattaneo, A. (2002) *Mol. Cell. Neurosci.* **21**, 15–28
57. Houeland, G., Romani, A., Marchetti, C., Amato, G., Capsoni, S., Cattaneo, A., and Marie, H. (2010) *J. Neurosci.* **30**, 13089–13094
58. Braithwaite, S. P., Schmid, R. S., He, D. N., Sung, M. L., Cho, S., Resnick, L., Monaghan, M. M., Hirst, W. D., Essrich, C., Reinhart, P. H., and Lo, D. C. (2010) *Neurobiol. Dis.* **39**, 311–317
59. Baglietto-Vargas, D., Moreno-Gonzalez, I., Sanchez-Varo, R., Jimenez, S., Trujillo-Estrada, L., Sanchez-Mejias, E., Torres, M., Romero-Acebal, M., Ruano, D., Vizuete, M., Vitorica, J., and Gutierrez, A. (2010) *J. Alzheimer Dis.* **21**, 119–132
60. Moreno-Gonzalez, I., Baglietto-Vargas, D., Sanchez-Varo, R., Jimenez, S., Trujillo-Estrada, L., Sanchez-Mejias, E., Del Rio, J. C., Torres, M., Romero-Acebal, M., Ruano, D., Vizuete, M., Vitorica, J., and Gutierrez, A. (2009) *J. Alzheimer Dis.* **18**, 755–776
61. Sotthibundhu, A., Sykes, A. M., Fox, B., Underwood, C. K., Thangnipon, W., and Coulson, E. J. (2008) *J. Neurosci.* **28**, 3941–3946
62. Ruano, D., Vizuete, M., Cano, J., Machado, A., and Vitorica, J. (1992) *J. Neurochem.* **58**, 485–493

Supplemental Figure 1. Soluble fractions from 6 months PS1xAPP mice promoted the neuronal survival after deprivation. Primary neuronal cultures were incubated, for 24h, in: Neurobasal medium in presence (C+), in absence (C-) of B27 supplement; or in presence of soluble fractions (50 µg of protein) derived from 6- and 18-month-old WT and PS1xAPP mice. After treatment, the neuronal survival was tested by MTS assay (as recommended by the manufacturer). The experiment was done in triplicate and repeated twice. Significance difference between the different samples was determined by ANOVA followed by Tukey test

Supplemental Figure 2. A) sAPPalpha mediated GSK-3β phosphorylation was inhibited by PI3K and IGF-1R or IR inhibitors. Before stimulation, serum deprived N2a cell cultures were pre-treated (30 min) with 10µM Ly294002, 100 nM AG1024 or 500nM PPP and then stimulated with sAPPalpha as described. For these experiments, duplicate wells were treated in parallel with different inhibitors. These experiments were repeated twice with similar results. B) Soluble APPalpha promoted the primary neuronal survival. Primary neuronal cultures were incubated, for 24h, in: Neurobasal medium in presence (C+), in absence (C-) of B27 supplement; or in presence of 27nM and 54nM sAPPalpha. After treatment, the neuronal survival was tested by MTS assay. The experiment was done in triplicate and repeated twice. Significant differences were analyzed as in supplemental Fig.1

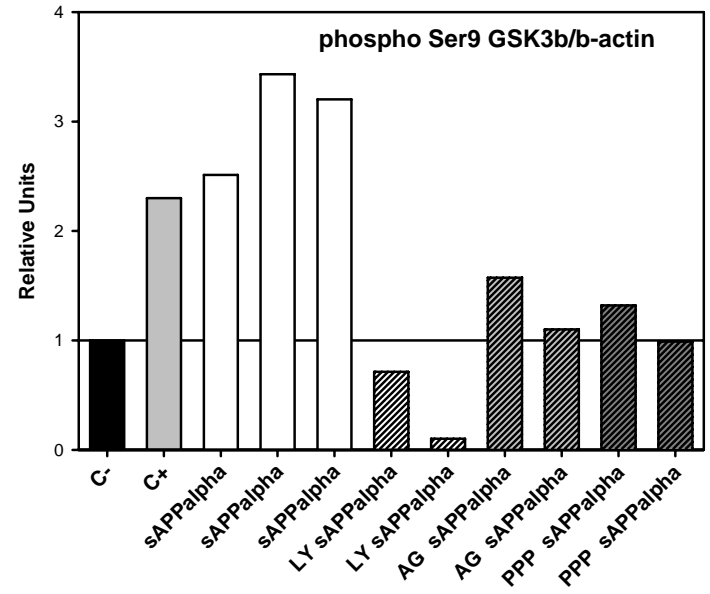
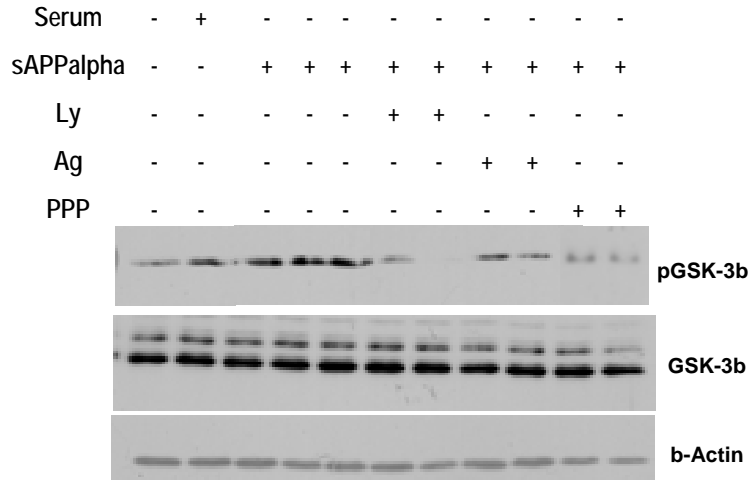
Supplemental Figure 3. The sAPPα and ADDL mediated opposite actions on GSK-3beta Ser9 phosphorylation and in ADDLs toxicity in neuronal primary cultures. A) The neuronal cultures were deprived (3 h) of B27 supplement (C-) and incubated for 30 min with: B27 (C+) or increasing concentrations of sAPPalpha (indicated in the Figure). B) The neuronal cultures were incubated (30 min) with different concentration (ranging from 0.01 to 2µM) of ADDLs. C) Neuronal toxicity was induced by the addition of saturating concentration (5 µM) of ADDL in presence of B27 or 54nM sAPPalpha. Additionally, in the same experiment we also assessed the protective effect of 50 µg 6-month PS1xAPP soluble fraction. The experiment was done in triplicate cultures. Significant differences were analyzed as in supplemental Fig.1

Supplemental Figure 4. ADDLs inhibition of IGF-1R, IR or TRK-A phosphorylation. For this analysis, the protein extracts described in Fig.5 were used and the Tyr phosphorylation of different receptors were analyzed by western blots. Westerns were representative of three different experiments. Note the high levels of TRK-A background due to the low expression of this receptor in N2a cells and the relative high amount of proteins (30 µg) needed for these particular western blots.

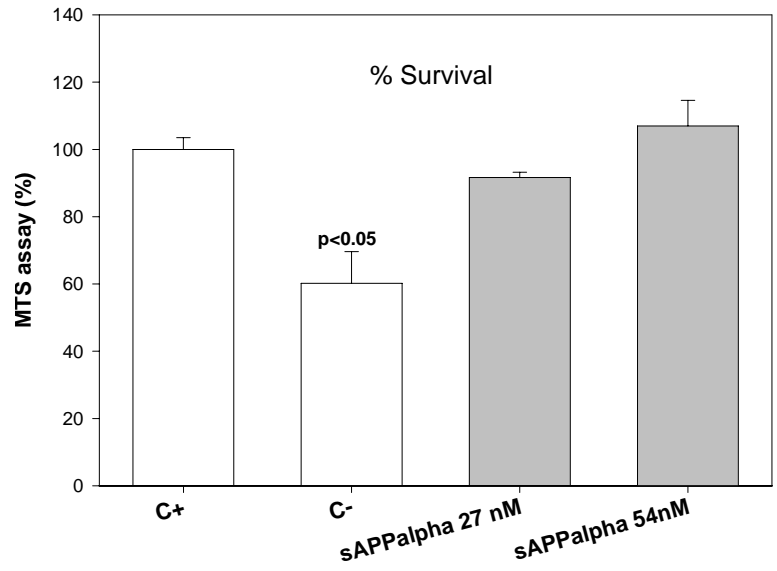


Supplemental Fig.1

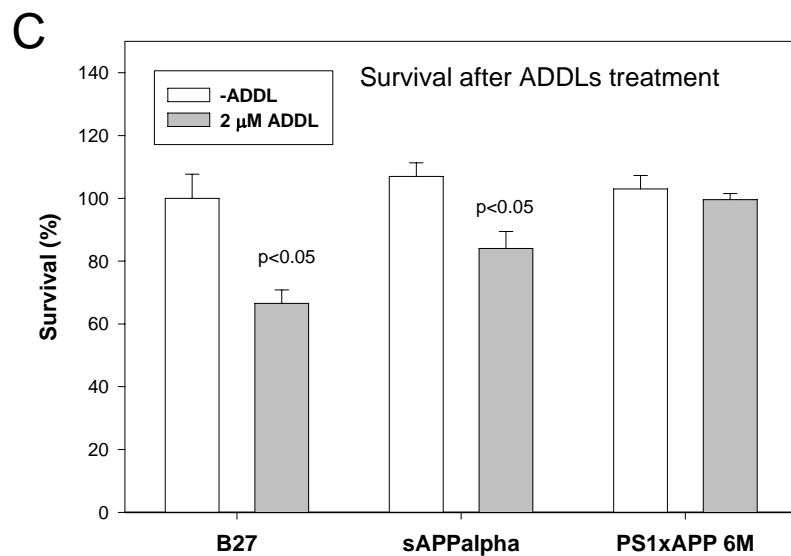
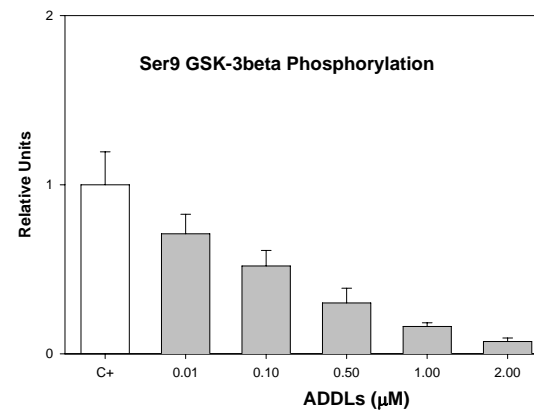
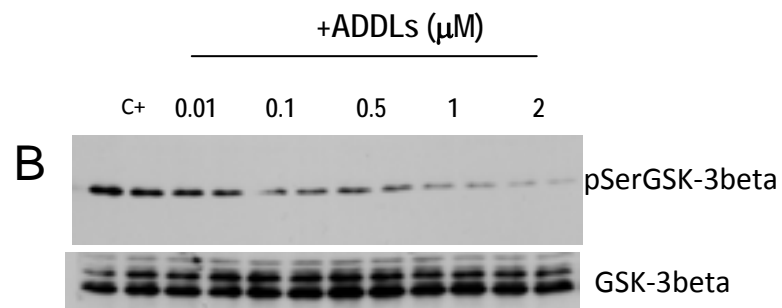
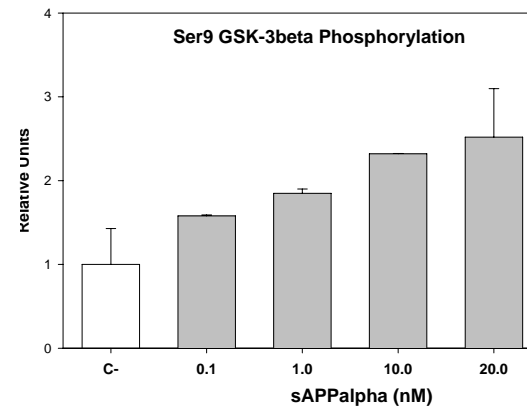
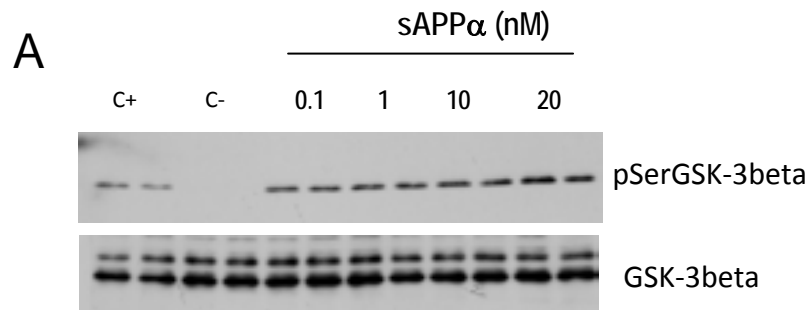
A



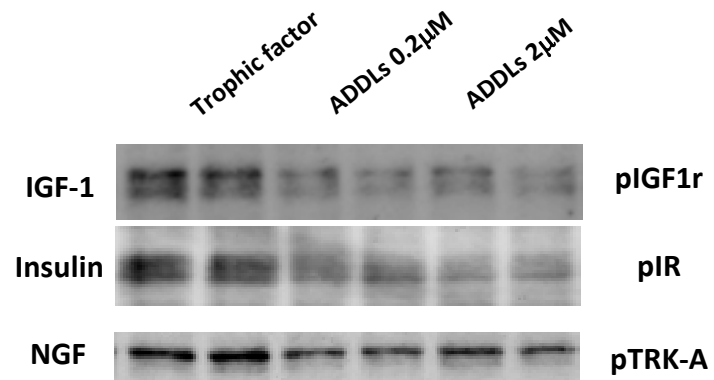
B



Supplemental Fig.2



Supplemental Fig.3



Supplemental Fig.4

Anexo 6

Sanchez-Varo R, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, De Castro V, Jimenez S, Ruano D, Vizuite M, Davila JC, Garcia-Verdugo JM, Jimenez AJ, Vitorica J, Gutierrez A. (2012). Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer's mice hippocampus. *Acta Neuropathol.*, 123(1):53-70.

Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer's mice hippocampus

Raquel Sanchez-Varo · Laura Trujillo-Estrada · Elisabeth Sanchez-Mejias · Manuel Torres · David Baglietto-Vargas · Ines Moreno-Gonzalez · Vanessa De Castro · Sebastian Jimenez · Diego Ruano · Marisa Vizueté · Jose Carlos Davila · Jose Manuel Garcia-Verdugo · Antonio Jesus Jimenez · Javier Vitorica · Antonia Gutierrez

Received: 22 July 2011 / Revised: 27 September 2011 / Accepted: 13 October 2011 / Published online: 22 October 2011
© The Author(s) 2011. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract Dystrophic neurites associated with amyloid plaques precede neuronal death and manifest early in Alzheimer's disease (AD). In this work we have characterized the plaque-associated neuritic pathology in the hippocampus of young (4- to 6-month-old) PS1^{M146L}/APP^{751SL} mice model, as the initial degenerative process underlying functional disturbance prior to neuronal loss. Neuritic plaques accounted for almost all fibrillar deposits and an axonal origin of the dystrophies was demonstrated. The early induction of autophagy pathology was evidenced by increased protein levels of the autophagosome marker LC3 that was localized in the axonal dystrophies, and by

electron microscopic identification of numerous autophagic vesicles filling and causing the axonal swellings. Early neuritic cytoskeletal defects determined by the presence of phosphorylated tau (AT8-positive) and actin-cofilin rods along with decreased levels of kinesin-1 and dynein motor proteins could be responsible for this extensive vesicle accumulation within dystrophic neurites. Although microsomal A β oligomers were identified, the presence of A11-immunopositive A β plaques also suggested a direct role of plaque-associated A β oligomers in defective axonal transport and disease progression. Most importantly, presynaptic terminals morphologically disrupted by abnormal autophagic vesicle buildup were identified ultrastructurally and further supported by synaptosome isolation. Finally, these early abnormalities in axonal and presynaptic structures might represent the morphological substrate of hippocampal dysfunction preceding synaptic and neuronal loss and could significantly contribute to AD pathology in the preclinical stages.

R. Sanchez-Varo · L. Trujillo-Estrada · E. Sanchez-Mejias · D. Baglietto-Vargas · I. Moreno-Gonzalez · V. De Castro · J. C. Davila · A. J. Jimenez · A. Gutierrez (✉)
Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos, 29071 Málaga, Spain
e-mail: agutierrez@uma.es

M. Torres · S. Jimenez · D. Ruano · M. Vizueté · J. Vitorica
Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Seville, Spain

J. M. Garcia-Verdugo
Laboratorio de Morfología Celular, Unidad Mixta Centro de Investigación Príncipe Felipe-UVEG, Valencia, Spain

R. Sanchez-Varo · L. Trujillo-Estrada · E. Sanchez-Mejias · M. Torres · D. Baglietto-Vargas · I. Moreno-Gonzalez · V. De Castro · S. Jimenez · D. Ruano · M. Vizueté · J. C. Davila · J. M. Garcia-Verdugo · J. Vitorica · A. Gutierrez
Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain

M. Torres · S. Jimenez · D. Ruano · M. Vizueté · J. Vitorica
Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS)-Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Seville, Spain

Keywords PS1/APP transgenic mice · Dystrophic neurites · Electron microscopy · LC3 · Amyloid plaques · Presynaptic terminals

Introduction

Alzheimer's disease (AD) gradually damages the function and structure of particularly vulnerable brain areas, as those used for memory and cognition. Accumulation of aggregated proteins at the extracellular (amyloid-beta, A β) and intracellular (hyperphosphorylated tau) levels is one of the major abnormalities found in the brain of AD patients (revised in [13, 26, 50]). Another key pathological feature, that defines this disease, is the early appearance of amyloid

plaque-associated neuritic changes in the form of dystrophic neurites, together with a selective loss of connections and neuronal groups. Dystrophic neurites, defined as thickened or irregular neuronal processes, are considered to be an expression of a widespread alteration of the neuronal cytoskeleton. In AD, dystrophic axons are particularly abundant in the hippocampal fiber systems originating from the subiculum, CA1, and the entorhinal cortex [57]. Synaptic loss in both the neocortex and the hippocampus is, so far, the best pathological correlate of early cognitive decline [19, 41, 52–54, 59, 61]. The initial neuritic degenerative changes may represent an early manifestation of axonal damage that precede the appearance of synaptic loss and, therefore, a promising disease-modifying morphological target for early intervention strategies to reverse the damage and rescue the deteriorating neurons. Supporting the idea that these changes could be potentially reversible, a recent study has reported that dystrophic axons surrounding amyloid plaques remain connected to viable neuronal bodies over a relatively long period of time [1].

The expression of the human amyloid precursor protein (APP) with single or double mutations in transgenic mouse lines leads to the formation of neuritic plaques with clusters of dystrophic neurites and glial recruitment that resembles the amyloid pathology seen in AD brains [4, 28]. After plaque formation, neuritic abnormalities progressively develop as shown by *in vivo* multiphoton imaging in an AD model [42]; however, the cellular dysfunction underlying the neuritic pathology is not well understood. Numerous autophagic vacuoles accumulate within dystrophic neurites in the brains of humans with AD and AD models [46, 47, 66] and several lines of investigation support the notion that defects in the autophagy process, a cellular catabolic mechanism essential for the degradation of aggregated proteins and organelles, significantly contributes to AD pathogenesis [11, 37, 46, 48]. Interestingly, it has been reported that autophagic compartments participate in APP processing and A β peptides production [65, 66] suggesting a possible causal relationship between plaque formation and neuritic dystrophy. Remarkably, restoring the intracellular autophagy pathway ameliorates disease progression and cognition deficits in a transgenic model [65] proving the potential therapeutic value of autophagy induction in early stages of the disease for neuronal function recovery.

Here, in this work, we have characterized the morphological and subcellular abnormalities associated with dystrophic neurites around plaques in the hippocampus of our PS1/APP model at 4–6 months of age. Such neuritic abnormalities may result in defects in maintaining axonal and synaptic terminals structure and function. As we have reported previously, this bigenic model reproduces major

amyloid-induced pathogenic steps seen in humans. The most relevant feature of our model is that, unlike many other transgenic mice in which neuronal loss is not observed, the selective neurodegenerative phenotype with specific subsets of interneurons and pyramidal neurons is affected in hippocampus and entorhinal cortex, following a regional and temporal pattern [5, 29, 44, 51]. This neuronal loss was found to be associated with a neurotoxic inflammatory response induced by soluble oligomeric A β peptides [29]. A better understanding of the pathological basis of the neuritic changes, prior to neuronal loss in this model, will provide valuable insights into the potential causes of early axonal damage and synaptic dysfunction and will further improve the accuracy of preclinical evaluation of novel therapeutic agents intended to reverse axonal damage.

Materials and methods

Transgenic mice

The generation and characterization of PS1/APP transgenic (tg) mice has been reported previously [5, 10, 12, 29, 30, 44, 51]. These double transgenic mice (C57BL/6 background) were obtained by crossing homozygotic PS1M146L transgenic mice with heterozygotic Thy1-APP751SL (Swedish: K670N, M671L and London: V717I FAD mutations) mice (Charles River, France). Mice represented F6–F10 offspring of heterozygous transgenic mice. Non-transgenic mice of the same genetic background and ages were used as controls. All animal experiments were carried out in accordance with the European Union regulations and approved by the committee of animal use for research at Malaga University.

Antibodies

The following primary antibodies were used in this study: anti-human amyloid precursor protein (hAPP) rabbit polyclonal (1:20,000, Sigma A8717); anti-A β (clone 6E10) mouse monoclonal (1:5,000, Sigma A1474); anti-oligomer A11 (recognizes A β 42 oligomers but not monomers or fibrils) rabbit polyclonal (1:500; Millipore AB9234); anti-A β 42 rabbit polyclonal (1:40; Biosource 44-344); anti-phospho-PHF-tau pSer202/Thr205 mouse monoclonal (clone AT8) (1:500; Pierce MN1020); anti-cofilin rabbit polyclonal (1:2,000, Cytoskeleton ACFLO2); anti-microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) goat polyclonal (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology Sc16755); anti-neurofilament 150 kDa rabbit polyclonal (1:5,000; Millipore AB1981); anti-microtubule-associated protein 2 (MAP-2); rabbit polyclonal (1:5,000; Chemicon Ab5622); anti-synaptophysin rabbit polyclonal (1:1,000; Abcam

ab14692); anti-vesicular GABA transporter (VGAT) guinea pig polyclonal (1:5,000; Calbiochem 676780); anti-vesicular glutamate transporter (VGLUT1) guinea pig polyclonal (1:10,000; Millipore AB5905); anti-human A β , N terminus (clone 82E1) mouse monoclonal (1:1,000, IBL 10323); anti-kinesin heavy chain (clone KN-01) mouse monoclonal (1:1,000, Abcam AB9097); anti-dynein, 74 kDa (clone 74.1) mouse monoclonal (1:1,000, Millipore MAB1618).

Tissue preparation

After deep anesthesia with sodium pentobarbital (60 mg/kg), 2-, 4- and 6-month-old control (WT), PS1 and PS1/APP tg mice were perfused transcardially with 0.1 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 followed by 4% paraformaldehyde, 75 mM lysine, 10 mM sodium metaperiodate in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. Brains were then removed, post-fixed overnight in the same fixative at 4°C, cryoprotected in 30% sucrose, sectioned at 40 μ m thickness in the coronal plane on a freezing microtome and serially collected in wells containing cold PBS and 0.02% sodium azide.

For electronic microscopy, 4.5-month-old PS1/APP tg mice were perfused transcardially with 0.1 M phosphate buffered saline (PBS)/1% heparin, pH 7.4 followed by 2.5% glutaraldehyde–2% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. After being removed, the brains were post-fixed in the same fixative overnight at 4°C, washed several times with PB, sectioned at 50 or 100 μ m thickness in the coronal plane on a vibratome (Leica VT1000M) and serially collected in wells containing cold PB and 0.02% sodium azide. Then, the 100- μ m sections were fixed in 2% osmium tetroxide in 0.1 M PB and dehydrated, to be finally embedded in Araldite (EMS, USA). Tissue blocks were cut serially into semithin (1.5 μ m) with a diamond knife in a Leica ultramicrotome (EM UC6), placed on slides, stained with 1% toluidine blue and explored with the light microscope for amyloid plaques. Then, selected areas from semithins were cut in ultrathin sections. Ultrathin sections were placed on Formvar-coated grids and stained with uranyl acetate and lead citrate before being examined with an electron microscope (FEI Tecnai Spirit, OR, USA).

Light microscopy immunohistochemistry

Serial sections from control (WT) and both tg mice (PS1 and PS1/APP) were processed in parallel for light microscopy immunostaining using the same batches of solutions to minimize variability in immunohistochemical labeling conditions. Free-floating sections were first treated with 3% H₂O₂/10% methanol in PBS, pH 7.4 for 20 min to inhibit endogenous peroxidases, and with avidin–biotin Blocking

Kit (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) for 30 min to block endogenous avidin, biotin and biotin-binding proteins. Sections were immunoreacted with one or two of the primary antibodies over 24 or 48 h at room temperature. The tissue-bound primary antibody was then detected by incubating for 1 h with the corresponding biotinylated secondary antibody (1:500 dilution, Vector Laboratories), and then followed by incubating for 90 min with streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (Sigma–Aldrich) diluted 1:2,000. The peroxidase reaction was visualized with 0.05% 3-3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma–Aldrich), 0.03% nickel ammonium sulphate and 0.01% hydrogen peroxide in PBS. After DAB, sections immunolabeled for APP, MAP-2, neurofilament or synaptophysin were incubated 3 min in a solution of 20% of Congo red. Sections were then mounted on gelatine-coated slides, air dried, dehydrated in graded ethanol, cleared in xylene and coverslipped with DPX (BDH) mounting medium. Specificity of the immune reactions was controlled by omitting the primary antisera.

For double immunofluorescence labelings, sections were first sequentially incubated with the indicated primaries antibodies followed by the corresponding Alexa488/568 secondary antibodies (1:1,000; Invitrogen). APP-immunolabeled sections were stained with 0.02% thioflavine-S in 50° ethanol for 5 min. Sections processed for immunofluorescence were mounted onto gelatin-coated slides, coverslipped with 0.01 M PBS containing 50% glycerin and 3% triethylenediamine and then examined under a confocal laser microscope (Leica SP5 II).

Immunoelectron microscopy

Sections of 50 μ m from 4.5-month-old PS1/APP mice were first washed with PBS and incubated in a 50 mM glycine solution 10 min in order to increase the antibody-binding efficiency. Following the standard immunohistochemical protocol, the tissue was incubated overnight in primary rabbit polyclonal antibodies anti-hAPP or anti-A β ₄₂ in a PBS 0.1 M/0.01% Tx-100/1% BSA solution at room temperature. Then, they were washed in PBS, and incubated with 1.4 nm gold-conjugated secondary antibody goat anti-rabbit IgG (1:100; Nanoprobes) for one night at room temperature. After postfixing with 1% glutaraldehyde and washing with 50 mM sodium citrate, the labeling was enhanced with the HQ Silver™ Kit (Nanoprobes). In negative control experiments, primary antibody was omitted. Then, the slices were processed by the standard fixation, dehydration and embedding steps.

Stereological analysis

Density and size of 6E10-positive amyloid plaques were obtained by stereology-based quantification in the

hippocampal formation of PS1/APP at 6 and 18 months of age ($n = 4/\text{age}$; 5 sections per animal) according to the optical fractionator method as previously described [44]. Briefly, an Olympus BX61 microscope and the NewCAST software package (Olympus, Glostrup, Denmark) were used. In order to obtain the plaque density, the number of plaques was quantified in five sections through the antero-posterior extent of the hippocampus and then divided between the sampled areas. CA1 subfields were defined using a 10 \times objective and the number of plaques was counted using a 40 \times objective. The number of counting frames varied with the hippocampal region or subfield layer analyzed. We used a counting frame of 7,154.7 μm^2 with step lengths of 84.58 \times 84.58 μm . Neurite and plaque sizes were estimated by the nucleator application with isotropic probes ($n = 5$ radii). The number of APP-positive dystrophic neurites per plaque was quantified over Congo red stained A β deposits. Each analysis was done by a single examiner blinded to sample identities.

Total protein extraction and Western blots

The protein pellets, obtained using the TripureTM Isolation Reagent, were resuspended in 4% SDS and 8 M urea in 40 mM Tris-HCl, pH 7.4 and rotated overnight at room temperature. The protein content was evaluated using Lowry.

Western blots were performed as described previously [12, 29, 51]. Briefly, 10–20 μg of protein from the different samples were loaded on 16% SDS-Tris-Tricine-PAGE and transferred to nitrocellulose (Hybond-C Extra, Amersham, Sweden). After blocking, the membranes were incubated overnight, at 4 $^{\circ}\text{C}$, with the appropriate antibody. The membranes were then incubated with anti-mouse horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibody (Dako, Denmark) at a dilution of 1/8,000. The blots were developed using the ECL-plus detection method (Amersham, Sweden). For quantification, the scanned (Epson 3200) images were analyzed using PCBAS program. In each experiment, the intensity of bands from WT mice and/or experimental condition were averaged and considered as 1 relative unit. Data were always normalized by the specific signal observed in 6-month-old WT group.

Synaptosomes and microsomes preparation, soluble fractions isolation and immunoprecipitation

The synaptosomal fractions were obtained basically as described previously [62]. Briefly, the tissue was homogenized (using a Dounce homogenizer) in 0.32 M Sucrose, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer (buffer A) containing complete protease and phosphatase inhibitor cocktails (Sigma). After homogenization, the crude synaptosomal

fraction (synaptosomes plus mitochondria) was isolated by two sequential centrifugations (1,500 $\times g$, 10 min followed by 12,500 $\times g$, 20 min; at 4 $^{\circ}\text{C}$). The crude synaptosomes were resuspended in 13% (final concentration) Ficoll 400 (in buffer A) and layered on the bottom of a discontinuous gradient, composed by buffer A and 7% Ficoll (in buffer A). The gradients were centrifuged at 100,000 $\times g$ (45 min at 4 $^{\circ}\text{C}$) and the synaptosomes were isolated at the 7.5–13% interface. After washing (twice with buffer A), the protein content of the synaptosomal fractions was quantified by Lowry.

The soluble and microsomal fractions (supernatant and pellet, respectively) from PS1/APP and WT mice were obtained after centrifugation at 100,000 $\times g$ (1 h, 4 $^{\circ}\text{C}$) as described previously [29, 30].

The A11 or 6E10 immunoprecipitation experiments were also performed as described in detail previously [29, 30]. Since the epitope recognized by A11 was sensitive to detergents, synaptosomes and microsomes were disturbed by sonication (4 pulses at 100 W, 30 s at 4 $^{\circ}\text{C}$). After sonication, the synaptosomes and microsomes were centrifuged (30,000 $\times g$, 30 min at 4 $^{\circ}\text{C}$) and soluble proteins were used for immunoprecipitation. A11 and 6E10 immunoprecipitation was done using 50 μg of soluble protein.

Statistical analysis

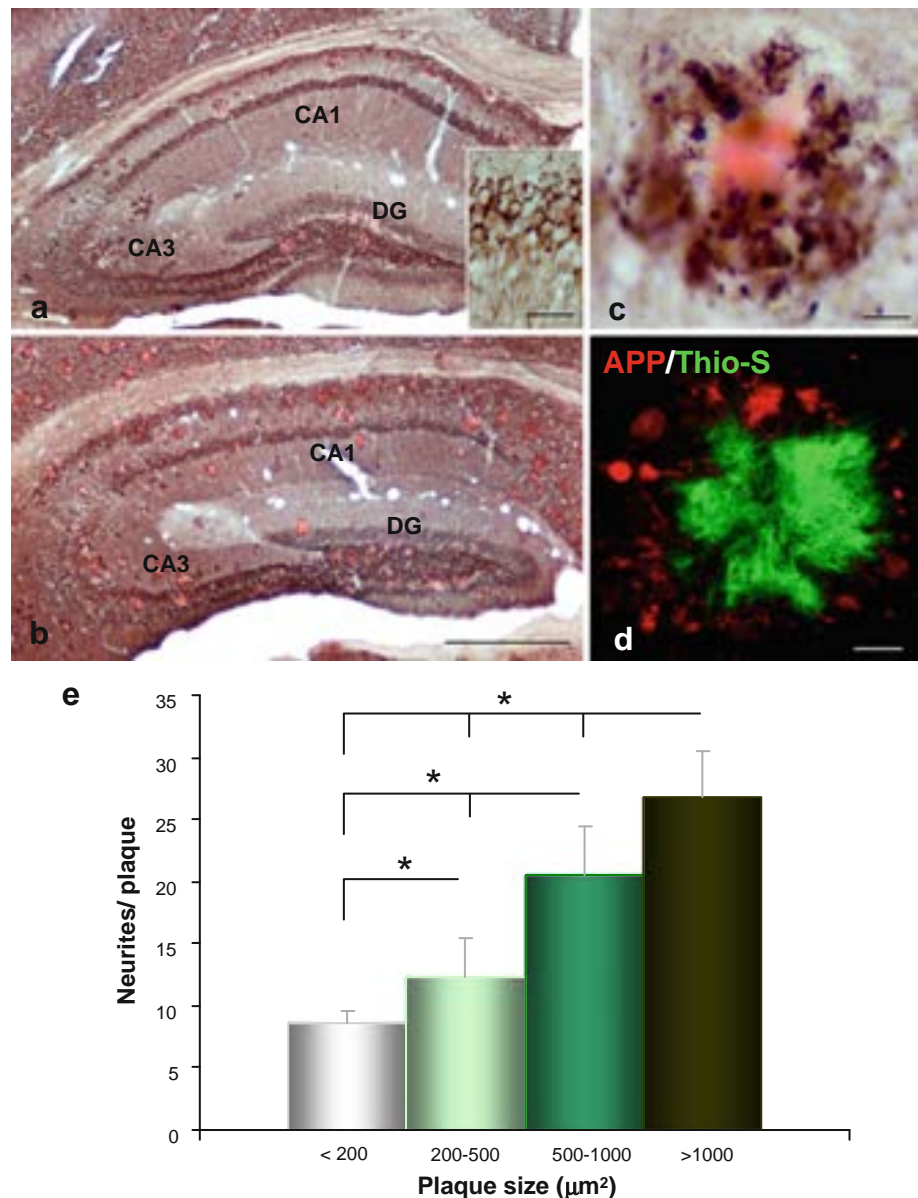
Data was expressed as mean \pm SD. The comparison between two mice groups (WT and PS1/APP mice or PS1 and PS1/APP tg mice) was done by two-tailed *t* test, and for comparing several groups (WT, PS1 and PS1/APP mice) and ages we used one-way ANOVA, followed by Bonferroni post hoc multiple comparison test (SigmaStat[®] 2.03, SPSS Inc). For both tests, the significance was set at 95% of confidence.

Results

Amyloid plaque-associated dystrophic neurites display a massive accumulation of autophagic vesicles from early ages

This PS1/APP transgenic model exhibited extracellular A β deposits throughout the hippocampus from a very early age as illustrated in Fig. 1a with Congo red staining at 4 months. The number and size of the amyloid deposits progressively increased with age (Fig. 1b). In young mice (4- to 6-month old), the most abundant plaques were those less than 500 μm^2 ($70.53 \pm 9.74\%$), whereas in older mice (18 months) the vast majority of plaques ($69.41 \pm 11.73\%$) were medium to large ($>500 \mu\text{m}^2$).

Fig. 1 Early plaque-associated neuritic dystrophy pathology in PS1/APP hippocampus. **a** and **b** APP-immunolabeled sections counterstained with Congo red for fibrillar amyloid deposits at 4 (**a**) and 6 (**b**) months of age showing the early occurrence of the neuritic pathology. The number of neuritic plaques progressively increases with age. APP-positive dystrophic neurites arise from glutamatergic neurons since the human APP transgene is exclusively expressed by principal neurons as shown in the *inset*. **c** A representative neuritic plaque formed by a core of congophilic fibrillar amyloid surrounded by numerous APP-positive dystrophic neurites. **d** Confocal image showing APP-positive dystrophic neurites (red) around a plaque stained with thioflavin-S (green). **e** Stereological quantification of the dystrophic neurites around plaques. The number of dystrophies/plaque increased with the size of plaque (μm^2). Data are expressed as mean \pm SD, $*p < 0.05$. Scale bars **a** and **b** 500 μm , *inset* 25 μm , **c** and **d** 10 μm . CA1–CA3 subfields of the hippocampus proper, DG dentate gyrus



Double labeling APP/Congo red (Fig. 1a–c) and APP/thioflavin-S (Fig. 1d) experiments demonstrated that, at every age examined, almost all ($91.61 \pm 0.14\%$, the percentage was practically identical at 4, 6 and 18 months of age) fibrillar amyloid deposits were decorated with clusters of APP-positive dystrophic neurites (APP is a well-reported marker for dystrophies) from the time of the appearance of amyloid plaques. The number of dystrophic neurites per plaque increased with age in parallel with the size of the plaque (Fig. 1e). Results showed that, in fact, the number of these dystrophic neurites correlated with the size of the plaque and was independent of the age of the mice. Thus, neuronal pathology in the form of dystrophic neurites occurred very early in this transgenic model. These pathological structures were not found in wild-type (WT) or

PS1 transgenic mice of the same age (data not shown). Therefore, plaque-associated abnormal swelling of neuronal processes represented an early indicator of disease development and might compromise neuronal integrity and hippocampal function in young PS1/APP mice. No dystrophic neurites were found in areas remote from A β plaques or in 2-month-old PS1/APP mice (before the A β deposition).

Transmission electron microscopy analysis of the hippocampus of 4.5-month-old PS1/APP mice revealed a close spatial association between amyloid plaques and neuronal dystrophies (Fig. 2a, b). No dystrophic neurites were found in areas remote from plaques. These abnormal swollen neurites had a round/oval profile and were giant-sized, compared to normal neuronal processes in the

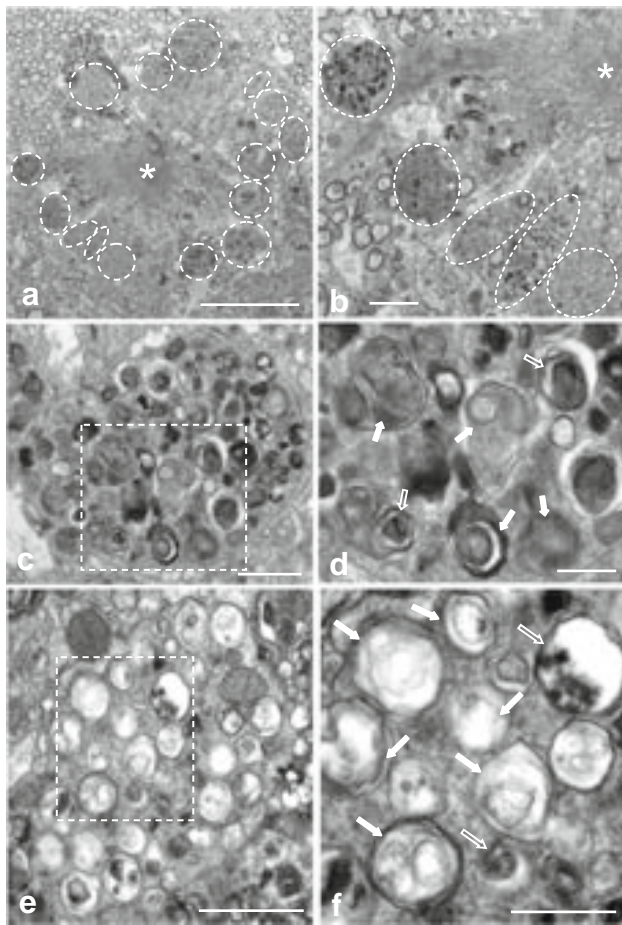


Fig. 2 Extensive accumulation of autophagic vesicles within dystrophic neurites around amyloid plaques. Transmission electron microscopy images of plaque-associated aberrant neurites in young PS1/APP hippocampus. **a** Low magnification image of an amyloid plaque (*asterisk*) surrounded by dystrophic neurites (*discontinuous white circles*). **b** A diversity of dystrophic neurites based on their subcellular content can be identified. **c** and **d** Dystrophic neurite filled with heterogeneous electron-dense double-membrane vesicles (*white square* magnified in **d**) belonging to the early degrading autophagy-lysosomal pathway (autophagosomes); these AVs had a dense compacted amorphous (*filled white arrows*) or multilamellar content (*empty white arrows*). **e** and **f** Dystrophic neurite filled with autophagic vesicles (*white square* magnified in **f**) of distinct morphologies showing translucent (*filled white arrows*) or amorphous electron-dense material (*empty white arrows*) which might represent late autophagic vesicles (autophagolysosomes). Scale bars **a** 10 μm , **b** 2 μm , **c** and **e** 1 μm , **d** and **f** 500 nm

adjacent neuropil. Ultrastructural morphometric analysis (100 aberrant neurites; $n = 3$) revealed that the predominant size of these dystrophic structures was between 10 and 50 μm^2 (63.74%), followed by those ranging from 50 to 100 μm^2 (20.43%). Notably, 5% of the dystrophic neurites measured over 100 μm^2 , only 9.68% of neurites were in the range 5–10 μm^2 and just 1% under 5 μm^2 . In contrast, normal non-dystrophic neurites had an average size of $1.42 \pm 0.77 \mu\text{m}^2$.

Dystrophic neurites were massively filled with collections of vacuolar structures of putative autophagic nature with different morphologies and heterogeneous intraluminal contents (Fig. 2c, e). The most common morphology corresponded to autophagic vesicles (AVs) consisting of double membrane-bound vesicles with densely compacted amorphous or multilamellar contents named as autophagosomes (Fig. 2c, d). These AVs represent the initial stages of autophagy which contain undigested compacted organellar material. In addition, there were also single or double membrane vesicles with translucent or amorphous electron-dense material in some dystrophic neurites (Fig. 2e, f), and these might presumably represent autophagosomes with partially digested material and/or the mature degradative forms of AVs (autophagolysosomes). Overall, a substantial accumulation of early and, to a less extent, late AVs within hippocampal aberrant neurites, surrounding amyloid plaques, occurred at very early ages in these PS1/APP mice.

LC3-positive autophagic vesicles within dystrophic neurites are implicated in the amyloidogenic pathway

To corroborate the autophagic nature of the heterogeneous vesicles accumulated within the dystrophic neurites, we immunostained PS1/APP hippocampal sections with the anti-LC3 antibody, a marker of autophagy (Fig. 3a, b). At 4 months (Fig. 3a), LC3 immunoreactivity was mainly found in pyramidal somata and their apical dendrites, as well as in punctate structures resembling dystrophic neurites around plaques (see insets in Fig. 3a). At 6 months (Fig. 3b), the immunoreactivity for LC3 around plaques was markedly increased while, in parallel, the staining of somata and apical dendrites decreased.

To more specifically determine the proportion of LC3 that was in the LC3-II form, which migrates faster than LC3-I on SDS-PAGE and is the form associated (by lipidation) with the autophagosomal structures, we performed quantitative immunoblot analysis of LC3-I and LC3-II forms in the hippocampus of 6-month-old PS1/APP and WT mice (Fig. 3c). Significantly higher levels of LC3-II were observed in PS1/APP mice than in age-matched WT mice (2.15 ± 0.35 fold, $n = 6$, $p < 0.05$).

Confocal imaging of double APP/LC3 immunolabeling (Fig. 3d1–d3) revealed the punctate nature of the LC3 labeling (see inset in Fig. 3d2) and the colocalization of LC3 in both APP-positive (glutamatergic) and non-APP (likely GABAergic or cholinergic) dystrophic neurites (Fig. 3d3). Considering the colocalization of APP and LC3 within dystrophic neurites in our AD model, we next wanted to assess the early implication of AVs in APP processing, and in turn likely involvement in A β production. To that end, we performed immunoelectron

microscopy for APP and A β_{42} in 4.5-month-old PS1/APP hippocampus. Silver-enhanced immunogold labeling revealed that APP localized preferentially to the AVs within plaque-associated dystrophic neurites (Fig. 3e–g), as well as to the Golgi and endoplasmic reticulum (ER) membranes in the neuronal cell somata (Fig. 3h). No APP-labeling was found in other organelles or plasma membrane. Immunoelectron microscopy detection of A β was much less stronger than of APP, since optimal intracellular labeling with the antibodies for A β forms in our model requires pre-treatment with formic acid which is not compatible with EM processing. Nevertheless, as expected and in contrast to APP immunolabeling, A β_{42} label was mainly associated with plaques (asterisk in Fig. 3i). Interestingly, some autophagic vesicles within dystrophic neurites were also positive for the A β_{42} antibody (inset in Fig. 3i).

Dystrophic neurites represent axonal structures with cytoskeletal abnormalities

To determine the dendritic and/or axonal nature of the plaque-associated dystrophic neurites in our PS1/APP model, we have performed light and electron microscopy studies in 4- to 6-month-old mice. Immunolabeling for the MAP-2 protein (a marker of dendritic processes) (Fig. 4a, b) and for the postsynaptic marker $\alpha 1$ GABA $_A$ R (not shown) revealed no positive dystrophic neurites around plaques at the early ages investigated. Moreover, confocal double MAP-2/APP immunofluorescence labeling confirmed the lack of colocalization for the dendritic marker in APP-positive dystrophic neurites (Fig. 4c1–c3). On the other hand, the close spatial relationship between amyloid plaques and axonal fibers tracts in the hippocampus, as revealed by neurofilament (NF) immunolabeling and Congo red staining (Fig. 4d), along with the presence of swollen NF-positive neurites (insets in Fig. 4d) indicated a possible axonal/synaptic origin of these dystrophic structures.

In fact, the labeling of the dystrophic neurites was very patent with the presynaptic marker synaptophysin (Fig. 4e). Numerous synaptophysin-positive punctated structures were observed around amyloid plaques. To determine the neurochemical nature of these synaptophysin-positive dystrophic neurites, we performed double immunofluorescence labeling for APP and the two major neurotransmitter vesicular transporters, VGLUT1 for glutamate (Fig. 4f1–f3) and VGAT for GABA (Fig. 4g1–g3). As shown in Fig. 4f3 most APP-positive dystrophic neurites contained VGLUT1 indicating the glutamatergic nature of the abnormal axons surrounding amyloid plaques. Consistent with the exclusive expression of the human mutated transgene for APP by principal cells, many

enlarged inhibitory GABAergic dystrophic neurites, immunonegative for APP, were also identified around the plaques (Fig. 4g3).

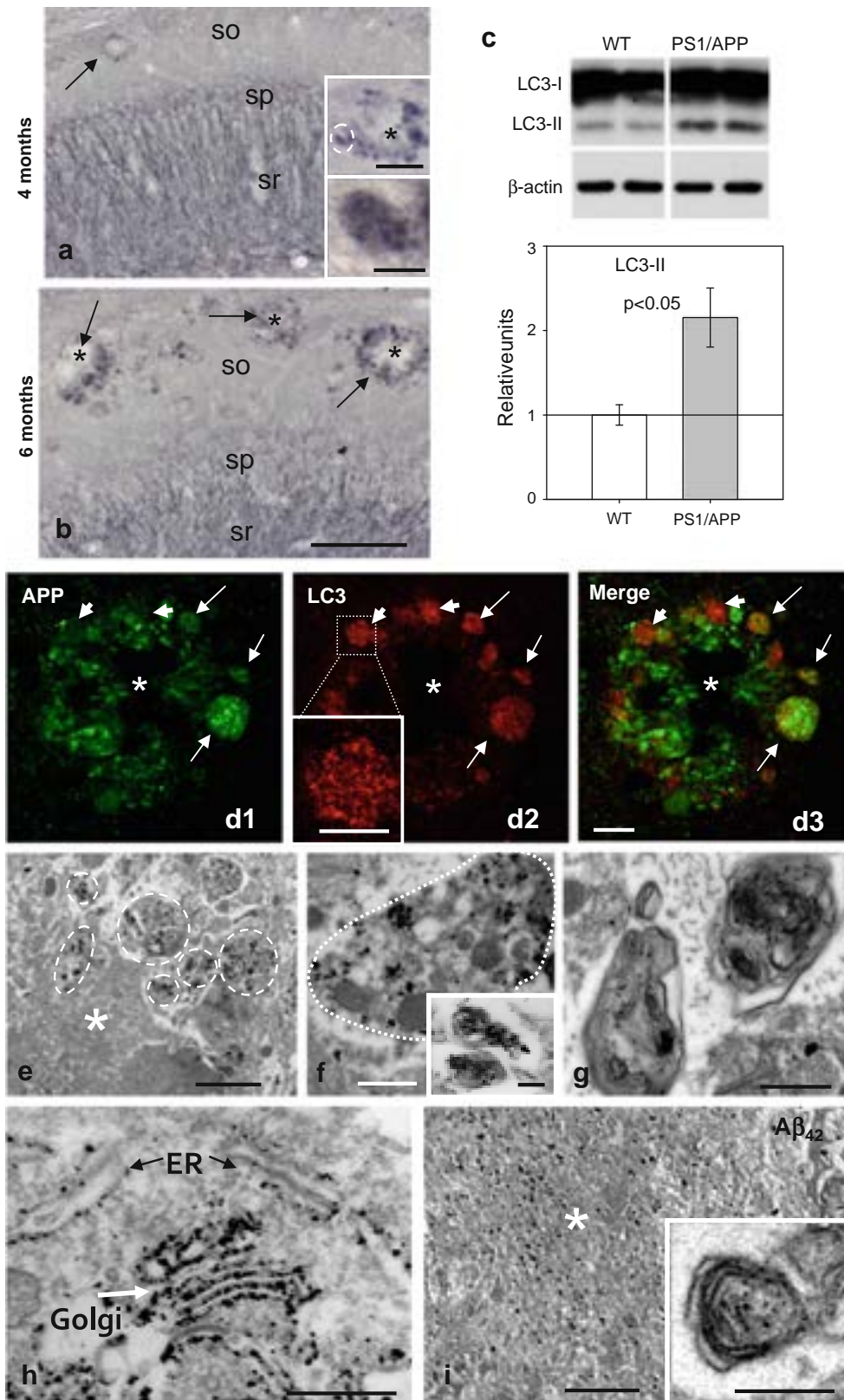
In addition, electron microscopy in the hippocampus of 4.5-month-old PS1/APP mice confirmed the presence of some dystrophic myelinated axons around/near plaques (Fig. 4h–j). These axonal dystrophies had a severe (Fig. 4h, i) to moderately (not shown) pathological number of autophagic vesicles. The enlarged size of an aberrant axon ($110.22 \mu\text{m}^2$) compared to adjacent normal ones ($1.57 \pm 0.63 \mu\text{m}^2$) is shown in Fig. 4j.

In order to identify possible early microtubule-associated axonal transport deficits in the PS1/APP hippocampus, which might lead to vesicle accumulation (autophagic, synaptic, etc.) along axons and the consequent development of dystrophy, we first assessed tau abnormalities by quantitative Western blots experiments with the AT8 antibody (which detects tau phosphorylated at both serine 202 and threonine 205 residues, one of the first to be phosphorylated) (Fig. 5a). Immunoblotting revealed a significantly higher level of expression in young PS1/APP mice (1.75 ± 0.15 fold) compared to age-matched controls. We have also confirmed by AT8 immunohistochemistry the presence of phospho-tau positive neurites surrounding amyloid plaques in 4- to 6-month-old transgenic animals (Fig. 5b). To determine whether phospho-tau was present within APP-positive dystrophic neurites, we performed double APP/AT8 immunofluorescence labeling (Fig. 5c1–c4 and d1–d4). The presence of AT8 was found in some, but not all, APP-positive dystrophic neurites (Fig. 5c3 and detail in c4; Fig. 5d3 and detail in d4).

Tau could also induce changes in the organization and stability of neuronal actin filaments, and it is known that the formation of cofilin/actin pathological bundles occludes neurites and vesicle transport. To assess possible early alterations of the actin cytoskeleton in our AD model we analyzed actin and cofilin immunolabeling in the hippocampus of young PS1/APP mice. Results showed numerous rod-like inclusions around amyloid plaques as shown for cofilin in Fig. 5e. Moreover, double APP/cofilin labeling (Fig. 5f1–f3) showed colocalization of both markers in some, particularly small, APP-positive neurites.

Finally, to further explore whether microtubule vesicular transport was compromised in young PS1/APP mice we measured the levels of kinesin-1 and dynein, two microtubule-associated motor proteins, in hippocampal protein extracts prepared from 6-month-old PS1/APP and WT mice (Fig. 5g). We found significantly lower levels of both kinesin-1 heavy chain ($-24.71 \pm 11.80\%$, $n = 8$) and dynein ($-38.06 \pm 14.40\%$, $n = 8$) in PS1/APP than age-matched WT animals.

These microtubule, actin cytoskeletal and molecular motor defects are early pathogenic events in our AD model



◀ **Fig. 3** Autophagic compartments within dystrophic neurites are sites of APP processing. **a** and **b** Immunohistochemistry for the autophagosomal marker LC3 in CA1 subfield of PS1/APP mice hippocampus. At 4 months (**a**), immunoreactivity was concentrated in pyramidal cell somata (stratum pyramidale) and their apical dendrites (stratum radiatum). LC3-positive dystrophic neurites were surrounded amyloid plaques (*upper inset* in **a**) and were punctate in nature (the *lower inset* shows a high magnification image of the LC3-positive dystrophy *circled in the upper inset*). At 6 months (**b**), the immunoreaction was mainly associated with dystrophic neurites around plaques (*arrows*) as shown here for stratum oriens (SO). **c** Quantitative immunoblot analysis of LC3-II form in the hippocampus of 6-month-old PS1/APP and WT mice. PS1/APP mice had significantly higher LC3-II levels than age-matched WT mice ($n = 6$, $p < 0.05$). **d1–d3** Confocal images of double immunofluorescence labeling for APP (*green*) and LC3 (*red*); APP-positive dystrophic neurites around an amyloid plaque (*asterisk*) displayed the LC3 marker (*long arrows*); some LC3-positive dystrophic neurites were negative for APP (*short arrows*) indicating the non-glutamatergic origin of these aberrant neurites. **e** Dystrophic neurites (*encircled*) around amyloid plaques (*asterisk*) were APP immunopositive as revealed by electron microscopy using silver-enhanced immunogold labeling. **f** Higher magnification of a dystrophic neurite immunopositive for APP; *small open squares* indicate mitochondria; *inset* shows two autophagosomes immunogold-labeled for APP. **g** Higher magnification image of two autophagic vesicles immunogold-labeled for APP. **h** In addition to autophagic vesicles, APP immunogold labeling was associated with the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi cisternae in neuronal somata. **i** Immunogold labeling revealed that A β 42 peptides localize to amyloid plaques (*asterisk*) and autophagic vesicles (*inset*). *so* stratum oriens, *sp* stratum pyramidale, *sr* stratum radiatum. *Scale bars a* and **b** 100 μ m (*upper inset* in **a** 50 μ m, *lower inset* in **a** 10 μ m); **d1–d3** 100 μ m (*inset* in **d2** 2.5 μ m), **e–h** 500 nm, *inset* in **f** 200 nm, **i** 2 μ m and *inset* 400 nm

and might lead to transport abnormalities and the accumulation of organelles (synaptic vesicles, autophagosomes, mitochondria, lysosomes) within axonal neurites promoting the dystrophic process.

The early axonal pathology includes morphologically disrupted presynaptic terminals

The axonal defects in our AD model could also affect presynaptic terminals. Therefore, in order to investigate the possible early synaptic pathology we examined the hippocampus of 4.5-month-old PS1/APP mice using electron microscopy (Fig. 6a–e). Our ultrastructural study showed that, near to amyloid plaques, there were presynaptic elements that displayed pathological changes including large diameter with a considerable number of AVs and, in contrast, fewer synaptic vesicles (Fig. 6a, b; presynaptic terminals outlined with a white line). The presence of presynaptic terminals, at the beginning of the dystrophy process, with few and early stage AVs formation, as well as with synaptic-like vesicles were also detected (Fig. 6c–e; see also the presynaptic terminal outlined with a black line in Fig. 6b). However, these altered presynaptic elements were making synaptic

contacts with morphologically normal dendrites or dendritic spines with postsynaptic density (see Fig. 6a–d). These morphologically altered presynaptic terminals may represent the initial stages of synaptic disruption and loss.

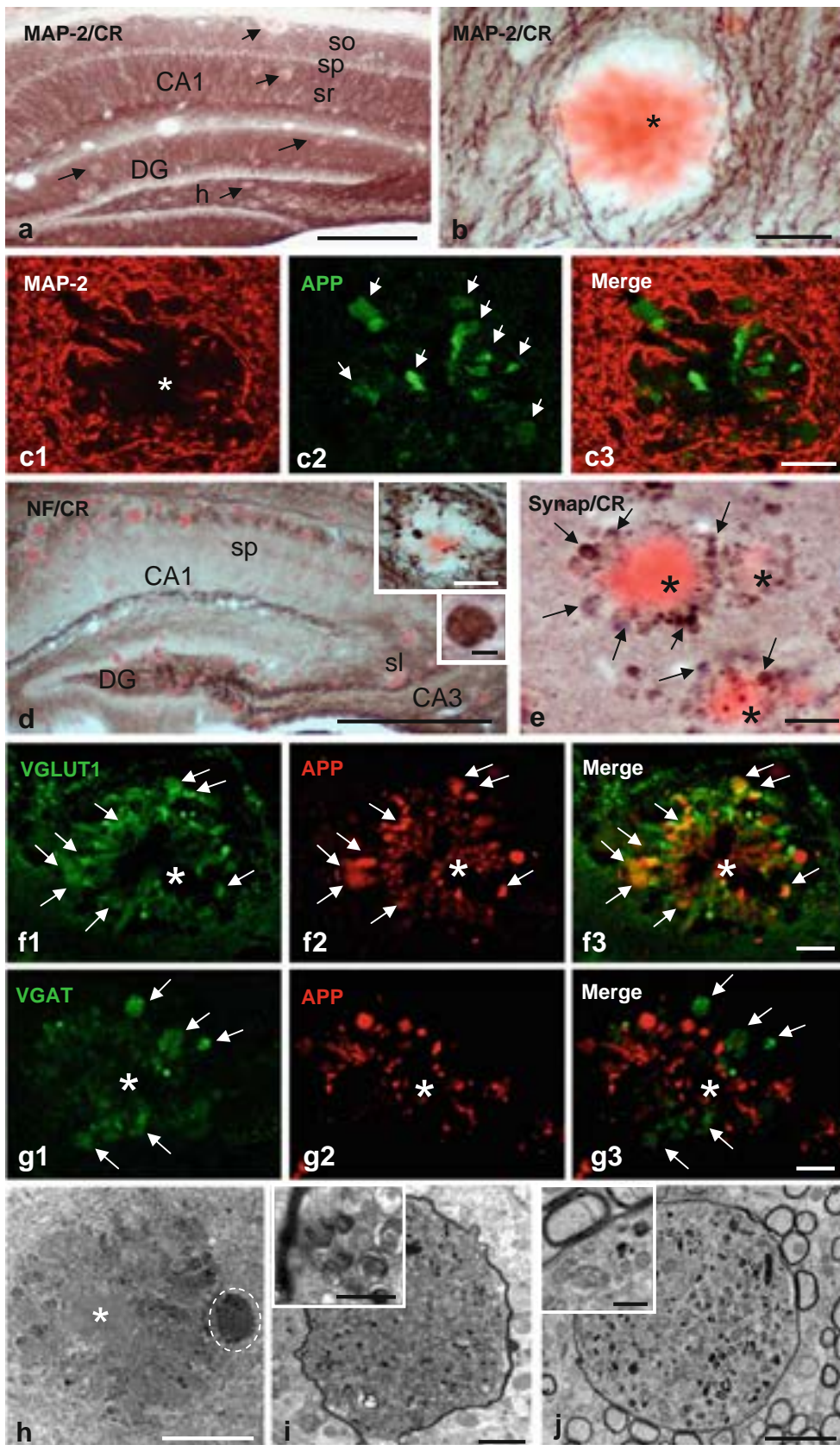
Moreover, we compared the LC3-II accumulation in synaptosomal and microsomal fractions isolated from 6-month-old WT and PS1/APP animals (Fig. 6f). As expected, a low percentage of LC3-II was observed in isolated synaptosomes from WT mice ($15.42 \pm 2.25\%$, $n = 4$, of microsomal fractions in WT mice). Further, in agreement with our electron microscopy studies, the amount of LC3-II in PS1/APP mice was higher in both synaptosomal and microsomal fractions. Although the relative abundance of LC3-II presented in PS1/APP-derived synaptosomes was still low ($22.22 \pm 3.84\%$ of PS1/APP microsomal LC3-II), the level was consistently higher (2.54 ± 0.54 , $n = 5$) than in WT synaptosomes.

These data demonstrated the existence of an early autophagy-associated axonal/synaptic pathology in the hippocampus of this AD mouse model.

Extracellular periplaque oligomeric A β spatially correlates with axonal/synaptic dystrophy

Taking into account the close spatial relationship between axonal dystrophies and A β plaques, we next examined the possible intracellular and/or extracellular origin of the pathogenic A β agent. We first investigated the possible intracellular accumulation of oligomeric A β in isolated synaptosomes and microsomes by immunoprecipitation experiments using the monoclonal antibody 6E10 (Fig. 7a). Results demonstrated the presence of a relatively large accumulation of monomeric A β in synaptosomes, whereas lower levels were detected in microsomes (Fig. 7a1). Furthermore, within the different A β peptides, the A β ₄₂ was the major form observed in these synaptosomal fractions (Fig. 7a2). On the other hand, no A β oligomers were observed with this approach.

We have also used the anti-oligomeric A β antibody A11 in immunohistochemistry and immunoprecipitation experiments. Our results demonstrated that most A β plaques were immunopositive for the A11 antibody (Fig. 7b), with a preferential immunolabeling at the plaque periphery (see inset). Furthermore, A11-immunoprecipitation using the soluble (S1) fractions demonstrated the presence of minute amount of extracellular oligomeric A β (Fig. 7c) in the hippocampus of the PS1/APP mice at this early age (6 months). These data were consistent with previous experiments (see also [29, 30]). However, in spite of the relative abundance of monomeric A β in synaptosomes, under the present experimental conditions, no A β oligomers



◀ **Fig. 4** Dystrophic neurites are of axonal origin. **a** MAP-2 (dendritic marker) and Congo red staining in the hippocampus of 6-month-old PS1/APP mice (*arrows* indicate amyloid plaques). **b** No dystrophic neurites immunopositive for MAP-2 were seen around amyloid plaques, as illustrated here for a Congo red stained amyloid plaque (*asterisk*) embedded in a MAP2-positive neuropil in the radiatum layer. **c1–c3** Confocal double immunofluorescence labeling for MAP-2 (*red*) and APP (*green*) revealed no colocalization of the two markers (*asterisk* indicates an amyloid plaque). **d** Strong overlapping in the location of hippocampal axonal pathways and amyloid plaques as shown here using neurofilament (NF) immunolabeling and Congo red staining. Axonal dystrophies were observed around congophilic plaques as shown in the *larger inset*, and a detail of an axonal swelling is shown in the smaller inset. **e** Neuritic dystrophies around plaques (*asterisk*) were immunopositive for synaptophysin (*arrows*). **f1–f3** Confocal laser double immunofluorescence labeling for APP (*red*) and VGLUT1 (*green*) shows extensive colocalization (*arrows*) of the two markers indicating the axonal glutamatergic nature of APP-positive dystrophic neurites around plaques (*asterisk*). **g1–g3** Double-label immunofluorescence confocal laser microscopy for APP (*red*) and VGAT (*green*) shows the existence of GABAergic axonal dystrophies (VGAT-positive and APP-negative; *arrows*) around amyloid plaques (*asterisk*). **h–j** Transmission electron microscopy images. **h** Low magnification image of an amyloid plaque (*asterisk*) surrounded by dystrophic neurites. **i** At a higher magnification, detail of the dystrophic myelinated axon circled in **h**; *the inset* shows the autophagic vesicle content of this axonal swelling and the myelin sheath. **j** Another representative image of a myelinated axonal swelling, filled with autophagic vesicles. The giant size of this dystrophy could be estimated by comparison with the adjacent normal myelinated axonal profiles; *inset* shows a detail of this axonal dystrophy. CA1–CA3 subfields of the hippocampus proper. DG dentate gyrus, *sp* stratum pyramidale, *sl* stratum lucidum. *Scale bars* **a** 250 μ m, **b** 25 μ m, **c1–c3** 15 μ m, **d** 500 μ m (*larger inset* 50 μ m and *smaller inset* 5 μ m), **e** 20 μ m, **f1–f3** and **g1–g3** 10 μ m, **h** 20 μ m, **i** 2 μ m (*inset* 200 nm), **j** 2 μ m (*inset* 500 nm)

were detected in this fraction (Fig. 7c). On the other hand, in the microsomal fractions, in the A11 immunoprecipitation experiments many non-specific bands were observed. The presence of this non-specific immunoprecipitation precluded the identification of putative oligomers. It is possible that the relative high abundance of AVs in this fraction could interfere with the immunoprecipitation experiments. Aiming to overcome this problem, the presence of the possible oligomers was also assayed using Western blots with 6E10 and 82E1 antibodies. The 6E10 antibody produced no specific signal (not shown); the 82E1 antibody, however, produced a clear specific (as compared with age-matched WT results) identification of A β oligomers (Fig. 7d). Taken together, these data indicate the presence of A β monomers in synaptosomes and A β oligomers in extracellular plaques and the microsomal fractions.

Discussion

Here we report data showing that amyloid plaques are associated with dystrophies of axonal origin (loaded with

autophagic vesicles) and constitute a very early pathological event in the hippocampus of PS1^{M146L}/APP^{751SL} mice. The presence of morphologically disrupted presynaptic terminals may be one of the initial stages for synaptic loss and dysfunction, so far the best correlate for early symptoms in AD patients [3, 9, 19, 41, 45, 52, 53, 59, 61] and, therefore, a pre-clinical manifestation of progression of the disease.

Amyloid accumulation is considered a key event in AD pathology by causing glial activation, neuritic alteration, synaptic damage and neuronal death [34, 35, 42]. All the fibrillar amyloid deposits in the hippocampus of our transgenic mice were identified as human-like neuritic plaques with dystrophic neurites and reactive gliosis. Dystrophic neurites are classically associated with compacted plaques in AD tissue [21, 24, 25, 39, 40, 57, 58] and these neuritic plaques have been considered to be a pathological correlation of dementia in AD patients [43]. Though neuritic dystrophy may apply to both dendritic and axonal morphological changes, in our model the predominant axonal nature of the dystrophies was demonstrated by colocalization with common axonal/synaptic (neurofilament, synaptophysin, VGLUT1 and VGAT) but not dendritic (MAP-2, α 1GABA_AR) markers. Furthermore, assessment of the dystrophies using electron microscopy also confirmed their axonal structure. Notably, a thorough examination of dystrophic neurites at the electron microscopic level revealed that they were not postsynaptic to any presynaptic bouton (not shown in results). Although we cannot rule out the existence of dendritic alterations, in our model most dystrophies displayed an axonal origin. The presence of axonal dystrophies has been reported in AD patients in both early and late stages of the disease [7, 21, 22, 57] and also in another AD models [1, 8, 14, 20, 49, 64].

As found in the brains of people with AD [47, 66] and in other transgenic models [65, 66], in our PS1/APP model the axonal dystrophies were seen to have a large accumulation of a great variety of vesicles in the process of autophagy. Autophagy, an efficient cellular degradation and maintenance pathway for multiple components, is not usually observed in normal brains. Recently, it has been demonstrated that PS1 mutations accelerate the pathogenesis of AD by impairing autophagy and organelle turnover, since PS1 is essential for autolysosome acidification and maturation [37]. The critical contribution of defective autophagy proteolytic clearance to the A β pathology has been recently demonstrated in TgCRND8 transgenic mice [65]. Restoring the autophagy-lysosomal pathway by deletion of cystatinB in these AD mice reduced intracellular and extracellular amyloid load, and rescued memory performance. The existence of autophagic pathology in hippocampal dystrophic neurites in our PS1/APP model was evidenced at early ages

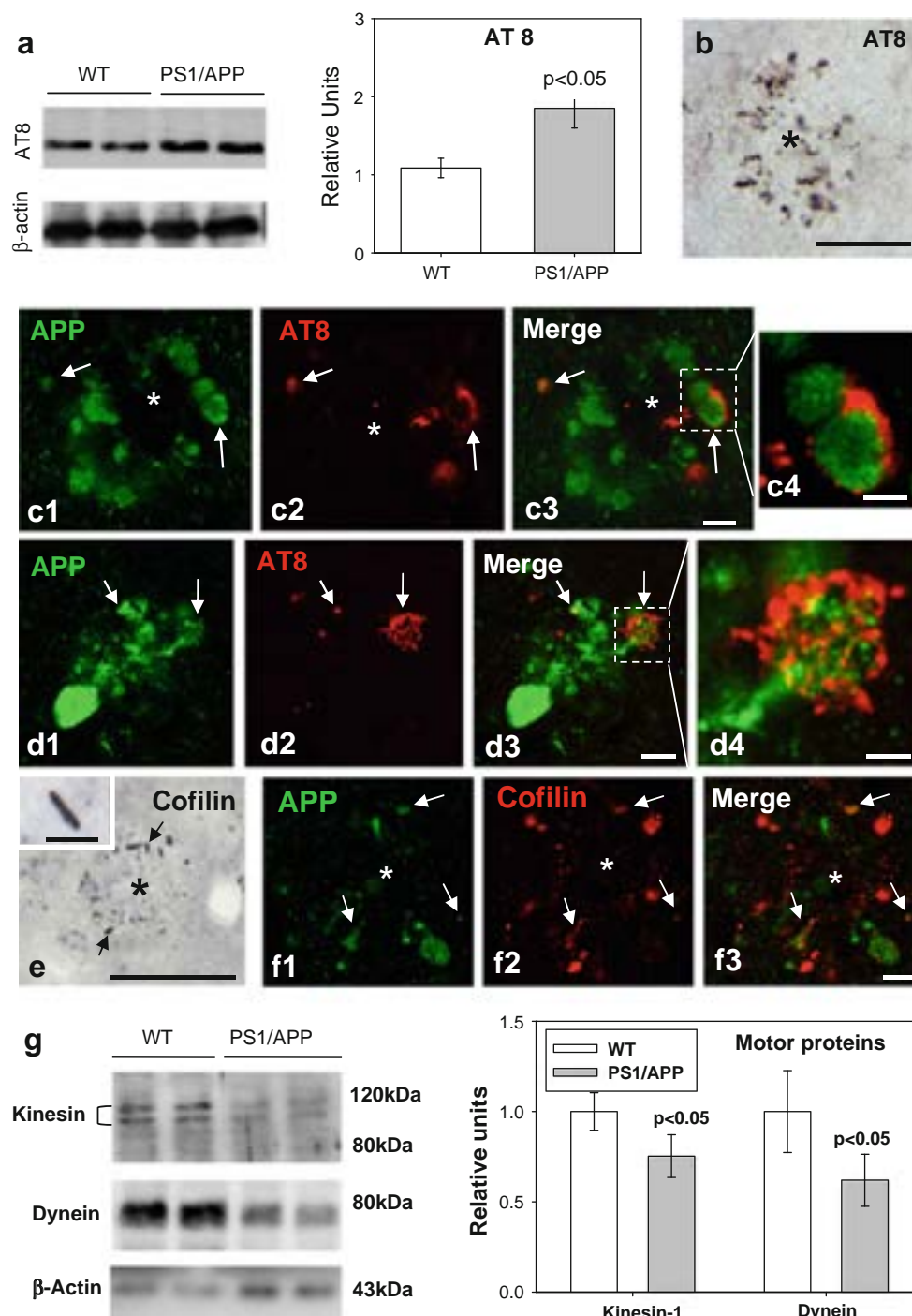


Fig. 5 Cytoskeletal pathology in young PS1/APP hippocampus. **a** Quantitative Western blotting using AT8 antibody in the hippocampus of 6-month-old PS1/APP and WT mice; PS1/APP mice had significantly higher AT8 levels than to age-matched WT mice ($n = 6$, $p < 0.05$). **b** The presence of AT8-positive structures around plaques (asterisk) was observed from 4 months of age. **c1–c4** and **d1–d4**. Double-label immunofluorescence confocal laser microscopy of APP (green) and AT8 (red) in 6-month-old transgenic mice showing the presence of phospho-tau in some APP-positive dystrophic neurites. **e** Immunohistochemistry for cofilin revealed the presence of actin-

cofilin rods around plaques (asterisk) from 4 months of age. A higher magnification detail of a rod is shown in the *inset*. **f1–f3** Confocal laser microscopy with double APP/cofilin labeling revealed the presence of cofilin within some APP-positive neurites. **g** Quantitative Western blotting for heavy chain kinesin-1 and dynein in 6-month-old PS1/APP and WT mice hippocampus. PS1/APP mice were found to have significantly lower kinesin-1 and dynein levels than age-matched WT mice ($n = 8$, $p < 0.05$). *Scale bars* **b** 100 μm , **c1–c3** 5 μm , **c4** 2.5 μm , **d1–d3** 7.5 μm , **d4** 2.5 μm , **e** 50 μm (*inset* 7 μm), **f1–f3** 7.5 μm

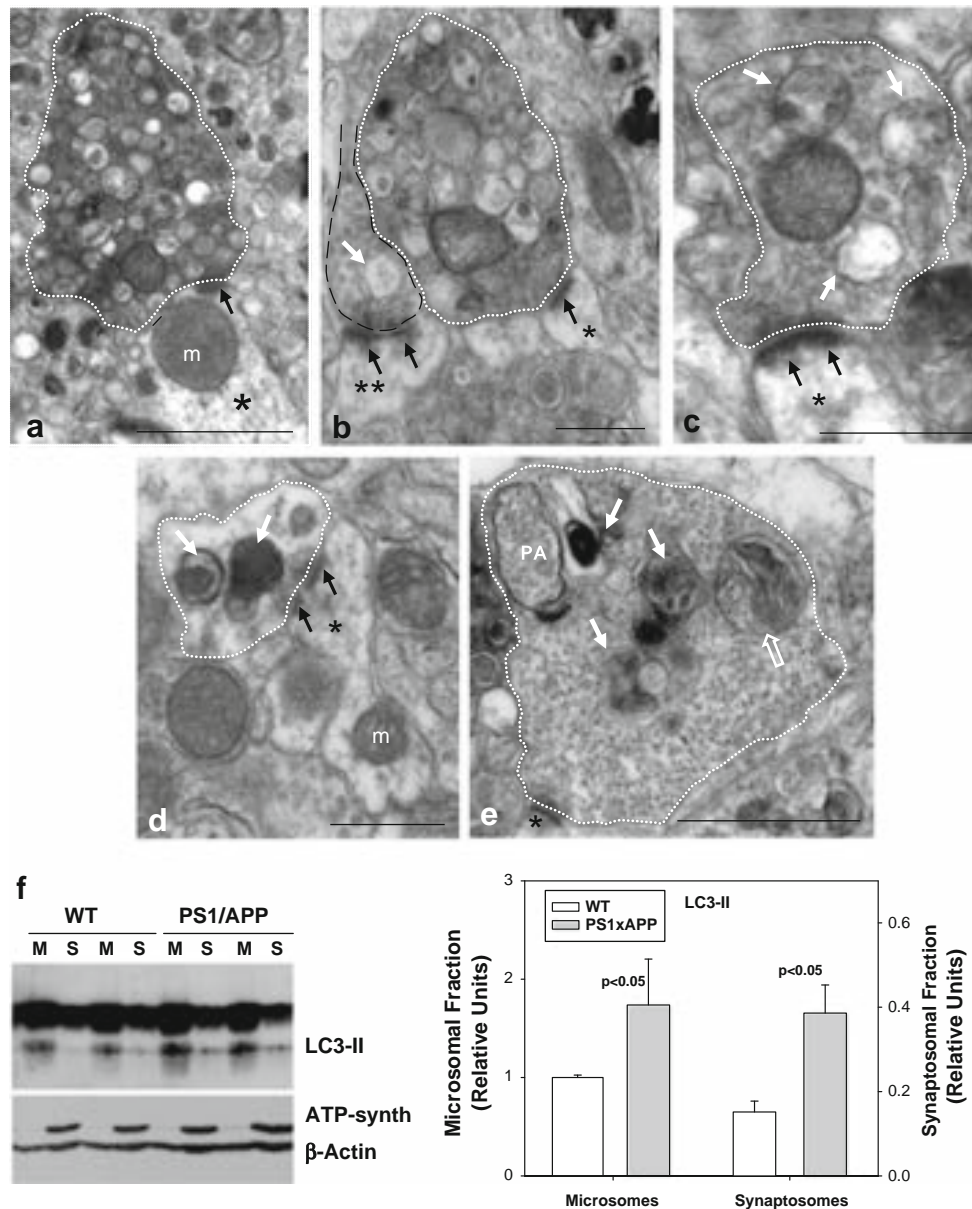


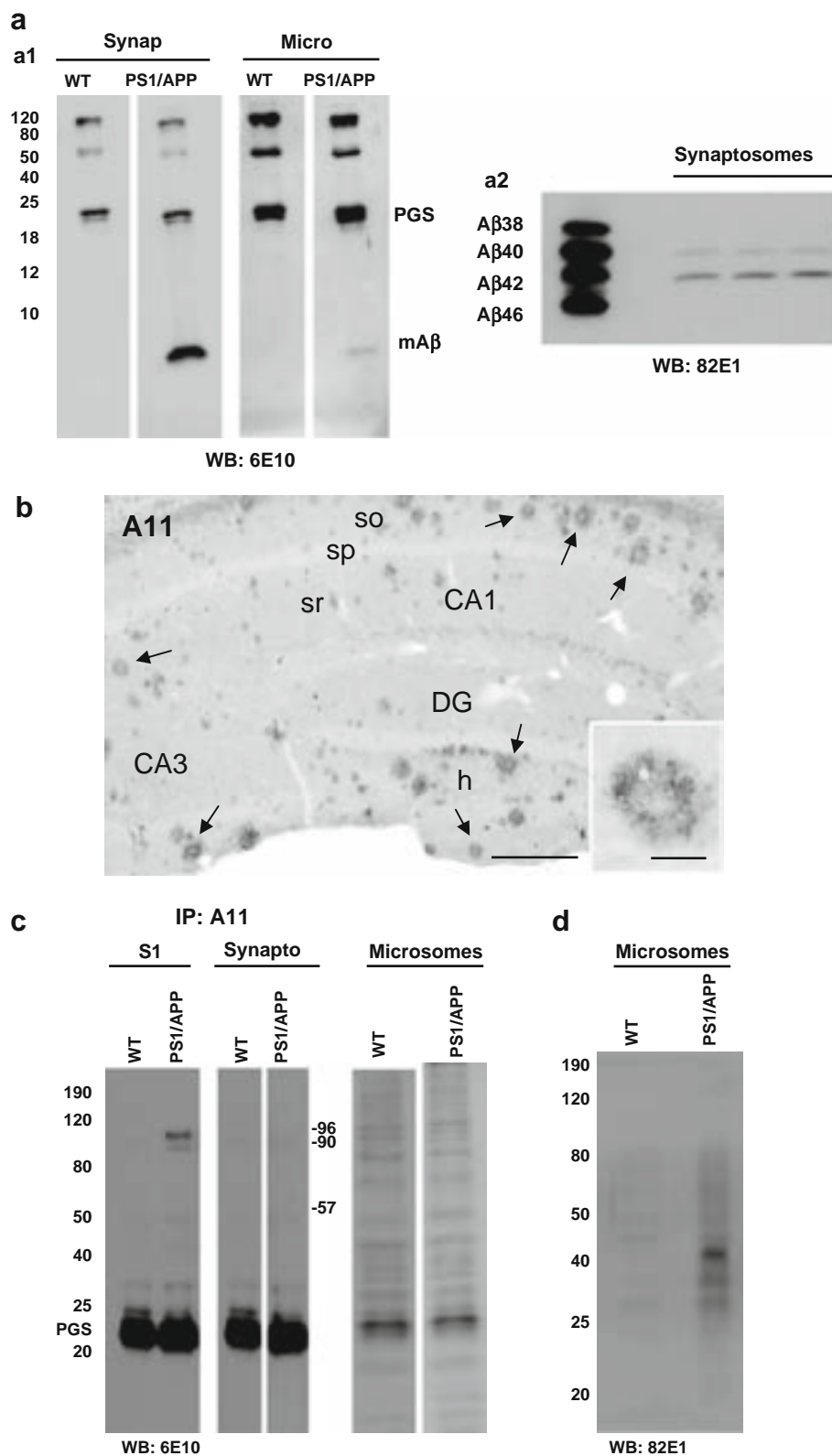
Fig. 6 Autophagy pathology correlates with aberrant presynaptic terminals. **a–e** Transmission electron microscopy images of aberrant axon terminals (outlined with white lines) containing autophagic vesicles and making asymmetric contact with normal postsynaptic elements (asterisks the postsynaptic densities are indicated with black arrows). **a** and **b** Severely disrupted presynaptic terminals (white lines) containing numerous autophagic vesicles and apparently no synaptic vesicles. A presynaptic element (outlined with black lines) that contains one autophagy vesicle (indicated with white arrow), near to the active zone is shown in **b**. **c** and **d** Presynaptic terminals in a probable initial stage of the dystrophy development, were characterized by the accumulation of relatively few autophagic vesicles (white arrows) and many synaptic vesicles. **e** Presynaptic terminal showing a putative phagophore (PA) engulfing synaptic-like vesicles, as well as an autophagosome containing mitochondria (open arrow) and few

autophagic vesicles containing degraded material (white arrows). **f** Quantitative immunoblot analyses of the LC3-II form in microsomes and synaptosomes from 6-month-old PS1/APP and WT mice. LC3-II accumulated in both microsomal and synaptosomal fractions of WT and PS1/APP hippocampus, though a predominant localization was found in the microsomal fraction. The levels of LC3-II in WT synaptosomes were extremely low, as compared with microsomes (please note the different scale bars). Although in PS1/APP most LC3-II was also present in microsomes, the relative accumulation was more patent in synaptosomes (as compared with WT). The relative abundance of LC3-II in each fraction was normalized by the values for WT microsomal fractions. ATPsynthase and β -actin were used as markers of purity in the isolation procedure and protein loading, respectively. *m* mitochondria. Scale bars **a** 1 μ m, **b–e** 500 nm

(4–6 months) by increased protein levels of the marker of autophagosome formation LC3-II, by specific immunolocalization of LC3 in the axonal dystrophies,

surrounding plaques, and by electron microscopy morphological identification of the AVs that were completely filling the axon and causing the local axonal swelling.

Fig. 7 Monomeric A β accumulates in isolated synaptosomes whereas A β oligomers are present in the plaque periphery and microsomes. **a** The A β content were analyzed by 6E10 immunoprecipitation and Western blots (16%-Tris-Tricine-SDS-PAGE) in synaptosomal and microsomal fractions from 6-month-old WT and PS1/APP mice (**a1**) or by 82E1 Western blots after urea-SDS-PAGE (16%) in PS1/APP synaptosomal fractions (**a2**). As shown, the monomeric A β was predominantly enriched in the synaptosomal fractions (**a1**). From the different A β peptides, the A β 42 was the predominant form found in synaptosomes (**a2**). **b** Oligomeric A β peptides were localized at the periphery of the plaques by immunohistochemistry with the A11 antibody. *Inset* shows a higher magnification of an immunostained amyloid plaque. **c** The presence of oligomeric A β in extracellular soluble fractions (S1), synaptosomes and microsomes was assessed by immunoprecipitation experiments, using the A11 antibody, and Western blots (6E10) using 12%-Tris-Glycine-SDS-PAGE. In agreement with a putative plaque origin, A β oligomers (57, 90 and 96 kDa) were identified in S1 fractions. **d** Representative Western blot of WT and PS1/APP microsomal fractions using the mAb 82E1. As shown, A β oligomers (ranging Mr 30–60 kDa) were clearly identified using this antibody. CA1–CA3 subfields of the hippocampus proper, DG dentate gyrus. *Scale bars* **b** 250 μ m (*inset* 25 μ m)



This agreement between different mice models and AD cases strongly support the involvement of autophagy in the development of AD.

Intact microtubules are needed for AVs transport and their clearance, facilitating fusion between autophagosomes and late endosomal and lysosomal compartments

thus preventing the accumulation of immature AVs in neurites [11, 33, 36]. Supporting the possible involvement of microtubule destabilization in AD pathogenesis, it has been recently reported [31] that natural oligomeric A β , isolated from AD patients, disrupted the microtubule cytoskeleton and caused neuritic dystrophy (see also [67]). This effect seemed to be mediated by tau hyperphosphorylation at Ser202/Ser205 (AT8 epitope). In fact, tau reduction prevents A β -induced impairment of axonal transport [63]. Interestingly, it has been just reported that disease-associated changes in tau conformation inhibit kinesin-dependent axonal transport by modulating axonal phosphotransferases [32]. In line with this our data indicated the existence of early defective axonal transport within dystrophic axons in our transgenic model. These dystrophic neurites displayed tau phosphorylation (AT8-positive) and actin-cofilin rods, and both alterations are known to alter cytoskeletal dynamics in neurons (revised in [6]). Moreover, both the kinesin-1 and dynein levels were significantly reduced and, although non-significantly at 6 months of age, neurofilaments (H and M chains) were phosphorylated (not shown). Taken together, our current results suggest that early tau phosphorylation produced axonal transport defects leading to AV accumulation and neurite pathology.

A relevant issue is the pathogenic signal behind this tau and transport dysregulation. The density and size of the neuritic plaques in our transgenic model increased in an age-dependent manner while the number of the associated dystrophic neurites was strongly related to the plaque size. The relationship between formation of extracellular amyloid deposits and their associated dystrophies remains elusive. Whereas some authors have proposed that the appearance of dystrophic neurites precedes plaque formation [2, 23, 27, 56], a recent study using *in vivo* multiphoton imaging showed that dystrophies develop following amyloid deposition [42]. Supporting the later notion, in our AD model the onset of dystrophic neurites occurred in parallel to the formation of amyloid plaques, and most (if not all) dystrophic neurites were associated with A β plaques. Furthermore, we have also observed plaque-associated axonal dystrophies in GABAergic and cholinergic neurons ([5, 44, 51]; this work, see Fig. 4g, and unpublished results). These neurons did not express the transgenic APP and, consequently, did not accumulate intracellular A β [5, 44, 51]. Thus, the formation of the dystrophic neurites in these neurons might be induced by extracellular A β , in close proximity to plaques. In contrast, the high content of APP within the dystrophic neurites suggests a possible direct role of such malformations in plaque formation. Increasing evidence implicates axons as an important source of extracellular amyloid deposits [68] and synaptic activation promotes amyloid secretion, whereas chronic reduction of synaptic activity was found to reduce

plaque loading in an AD transgenic mouse model [15, 16, 60]. Interestingly, in our transgenic model, hippocampal plaque deposition is tightly linked to axonal pathways, as seen by simultaneous Congo red staining and neurofilament immunostaining. This agrees with the idea of A β released by axonal terminals and the consequent formation of extracellular deposits. In any case, the two processes, plaque induction of neuritic changes and a contribution of dystrophic neurites to A β deposition are not mutually exclusive and could occur concomitantly.

The soluble forms of oligomeric amyloid peptides are of special interest to play a significant role in AD pathology. Soluble A β oligomers have been shown to induce an increase in tau hyperphosphorylation [17, 31] as well as severe axonal transport failure and disruption of organelle trafficking through GSK3-beta signalling (manuscript in preparation; [18, 31]). Furthermore, we have recently reported [30] the involvement of natural and synthetic A β oligomers in the activation of GSK3-beta and tau phosphorylation. Thus, it is tempting to speculate that A β oligomers, acting through a yet unidentified mediator, caused the interruption of axonal transport, accumulation of vesicles and axonal dystrophy.

The extracellular or intracellular origin of these soluble amyloid oligomers has not yet been well defined. In relation to this, as recently reported in AD cases [55], the results we report here demonstrate that PS1/APP synapses accumulate A β peptides (A β ₄₂ the most abundant). However, these A β peptides were in monomeric form and no oligomers were detected at this age. On the other hand, we also identified, by immunogold labeling, the presence of APP and A β ₄₂ in AVs which agrees with the participation of the autophagic compartments in APP processing and A β production, as described by others [65, 66]. We also found that AVs were mainly accumulated in the microsomal fractions and, although the A β seemed to be produced principally in the synapses, A β oligomers were identified in these microsomal fractions. These results provide evidence for the idea that the AVs, within the axonal dystrophies, are a possible compartment for A β oligomerization. On the other hand, taken together, the close temporal and spatial association between amyloid plaques and dystrophic neurites, the presence of A11-positive A β oligomers in the plaque periphery and the A β oligomers in the soluble fractions suggested that plaques also might be a source of the A β oligomers that could induce neuritic damage. In support of this idea, amyloid fibrils, major component of amyloid plaques, can be destabilized and easily reverted to soluble and highly toxic A β aggregates by biological lipids that are present in the brain [38] and, as mentioned above, GABAergic cells (that did not express hAPP and did not accumulate A β peptides) also displayed axonal

dystrophies. In any case, further experiments are needed to clarify this point.

A further significant result was the identification by electron microscopy of dystrophic axon terminals that were making contact with morphologically normal postsynaptic elements. These abnormal presynaptic boutons contained numerous AVs and were observed to have a low content in synaptic vesicles. These results were confirmed by LC3-II Western blots using synaptosomes isolated from the hippocampus of 6-month-old PS1/APP mice. Although we cannot rule out a direct effect of soluble A β on these presynaptic terminals, their relative distance from A β plaques (between 10 and 30 μ m) together with the low soluble A β content at this age, suggested that AV accumulation might reflect the axonal transport defects at dystrophies. These altered synaptic terminals may represent one of the initial pathogenic steps of synaptic loss leading to early deficits in synaptic transmission and plasticity.

As early memory loss in AD is increasingly attributed to synaptic failure, we can conclude that this PS1/APP transgenic model shows, at young ages and in absence of pyramidal degeneration, a presynaptic pathology progression that may closely resemble the pre-clinical or early stages of human AD.

Acknowledgments This work was supported by grants PS09/00099 (to A.G.), PS09/00151 (to J.V.), PS09/00848 (to D.R.) and PS09/00376 (to A.J.J.) from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS)-Instituto de Salud Carlos III, Spain. Financial support was also received from Junta de Andalucía grants SAS P09/496 (to A.G.) and CTS-4795 (to J.V.). R.S.V., V.D.C. and S.J. were the recipients of a contract from CIBERNED. E.S.M. and L.T.E. held a PhD fellowship from Spain FPU program. We thank Mercedes Aneiros for her excellent technical assistance and Mario Soriano for his help with the transmission electron microscope.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

References

- Adalbert R, Nogradi A, Babetto E et al (2009) Severely dystrophic axons at amyloid plaques remain continuous and connected to viable cell bodies. *Brain* 132:402–416
- Arendt T (2005) Alzheimer's disease as a disorder of dynamic brain self-organization. *Prog Brain Res* 147:355–378
- Arendt T (2009) Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 118:167–179
- Ashe KH, Zahs KR (2010) Probing the biology of Alzheimer's disease in mice. *Neuron* 66:631–645
- Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Sanchez-Varo R et al (2010) Calretinin interneurons are early targets of extracellular amyloid-beta pathology in PS1/AbetaPP Alzheimer mice hippocampus. *J Alzheimers Dis* 21:119–132
- Bamburg JR, Bloom GS (2009) Cytoskeletal pathologies of Alzheimer disease. *Cell Motil Cytoskelet* 66:635–649
- Bell KF, Claudio CA (2006) Altered synaptic function in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* 545:11–21
- Bell KF, de Kort GJ, Steggerda S et al (2003) Structural involvement of the glutamatergic presynaptic boutons in a transgenic mouse model expressing early onset amyloid pathology. *Neurosci Lett* 353:143–147
- Bertoni-Freddari C, Fattoretti P, Solazzi M et al (2003) Neuronal death versus synaptic pathology in Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* 1010:635–638
- Blanchard V, Moussaoui S, Czech C et al (2003) Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with Abeta deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp Neurol* 184:247–263
- Boland B, Kumar A, Lee S et al (2008) Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 28:6926–6937
- Caballero C, Jimenez S, Moreno-Gonzalez I et al (2007) Inter-individual variability in the expression of the mutated form of hPS1M146L determined the production of Abeta peptides in the PS1xAPP transgenic mice. *J Neurosci Res* 85:787–797
- Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA (2010) Alzheimer disease. *Dis Mon* 56:484–546
- Chishti MA, Yang DS, Janus C et al (2001) Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *J Biol Chem* 276:21562–21570
- Cirrito JR, Kang JE, Lee J et al (2008) Endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of amyloid-beta in vivo. *Neuron* 58:42–51
- Cirrito JR, Yamada KA, Finn MB et al (2005) Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. *Neuron* 48:913–922
- De Felice FG, Wu D, Lambert MP et al (2008) Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by Abeta oligomers. *Neurobiol Aging* 29:1334–1347
- Decker H, Lo KY, Unger SM, Ferreira ST, Silverman MA (2010) Amyloid-beta peptide oligomers disrupt axonal transport through an NMDA receptor-dependent mechanism that is mediated by glycogen synthase kinase 3beta in primary cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 30:9166–9171
- DeKosky ST, Scheff SW (1990) Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol* 27:457–464
- Delatour B, Blanchard V, Pradier L, Duyckaerts C (2004) Alzheimer pathology disorganizes cortico-cortical circuitry: direct evidence from a transgenic animal model. *Neurobiol Dis* 16:41–47
- Dickson TC, King CE, McCormack GH, Vickers JC (1999) Neurochemical diversity of dystrophic neurites in the early and late stages of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 156:100–110
- Dickson TC, Vickers JC (2001) The morphological phenotype of beta-amyloid plaques and associated neuritic changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 105:99–107
- Fiala JC (2007) Mechanisms of amyloid plaque pathogenesis. *Acta Neuropathol* 114:551–571
- Geddes JW, Anderson KJ, Cotman CW (1986) Senile plaques as aberrant sprout-stimulating structures. *Exp Neurol* 94:767–776
- Geddes JW, Monaghan DT, Cotman CW et al (1985) Plasticity of hippocampal circuitry in Alzheimer's disease. *Science* 230:1179–1181
- Gomez-Isla T, Spire T, de Calignon A, Hyman BT (2008) Neuropathology of Alzheimer's disease. *Handb Clin Neurol* 89:233–243

27. Gouras GK, Almeida CG, Takahashi RH (2005) Intraneuronal Abeta accumulation and origin of plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 26:1235–1244
28. Hussain I (2010) APP transgenic mouse models and their use in drug discovery to evaluate amyloid-lowering therapeutics. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9:395–402
29. Jimenez S, Baglietto-Vargas D, Caballero C et al (2008) Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *J Neurosci* 28:11650–11661
30. Jimenez S, Torres M, Vizuete M et al (2011) Age-dependent accumulation of soluble Abeta oligomers reverses the neuroprotective effect of sAPPalpha by modulating PI3K/Akt-GSK-3beta pathway in Alzheimer mice model. *J Biol Chem* 286:18414–18425
31. Jin M, Shepardson N, Yang T et al (2011) Soluble amyloid {beta}-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:5819–5824
32. Kanaan NM, Morfini GA, Lapointe NE et al (2011) Pathogenic forms of tau inhibit kinesin-dependent axonal transport through a mechanism involving activation of axonal phosphotransferases. *J Neurosci* 31:9858–9868
33. Kochl R, Hu XW, Chan EY, Tooze SA (2006) Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic* 7:129–145
34. Koenigsknecht-Talboo J, Meyer-Luehmann M, Parsadanian M et al (2008) Rapid microglial response around amyloid pathology after systemic anti-Abeta antibody administration in PDAPP mice. *J Neurosci* 28:14156–14164
35. Koffie RM, Meyer-Luehmann M, Hashimoto T et al (2009) Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:4012–4017
36. Kovacs AL, Reith A, Seglen PO (1982) Accumulation of autophagosomes after inhibition of hepatocytic protein degradation by vinblastine, leupeptin or a lysosomotropic amine. *Exp Cell Res* 137:191–201
37. Lee JH, Yu WH, Kumar A et al (2010) Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell* 141:1146–1158
38. Martins IC, Kuperstein I, Wilkinson H et al (2008) Lipids revert inert Abeta amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice. *EMBO J* 27:224–233
39. Masliah E, Alford M, Adame A et al (2003) Abeta1–42 promotes cholinergic sprouting in patients with AD and Lewy body variant of AD. *Neurology* 61:206–211
40. Masliah E, Hansen L, Albright T, Mallory M, Terry RD (1991) Immunoelectron microscopic study of synaptic pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 81:428–433
41. Masliah E, Mallory M, Alford M et al (2001) Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology* 56:127–129
42. Meyer-Luehmann M, Spires-Jones TL, Prada C et al (2008) Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature* 451:720–724
43. Mirra SS, Heyman A, McKeel D et al (1991) The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 41:479–486
44. Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R et al (2009) Extracellular amyloid-beta and cytotoxic glial activation induce significant entorhinal neuron loss in young PS1(M146L)/APP(751SL) mice. *J Alzheimers Dis* 18:755–776
45. Nimmrich V, Ebert U (2009) Is Alzheimer's disease a result of presynaptic failure? Synaptic dysfunctions induced by oligomeric beta-amyloid. *Rev Neurosci* 20:1–12
46. Nixon RA (2007) Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J Cell Sci* 120:4081–4091
47. Nixon RA, Wegiel J, Kumar A et al (2005) Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:113–122
48. Nixon RA, Yang DS (2011) Autophagy failure in Alzheimer's disease-locating the primary defect. *Neurobiol Dis* 43:38–45
49. Noda-Saita K, Terai K, Iwai A et al (2004) Exclusive association and simultaneous appearance of congophilic plaques and AT8-positive dystrophic neurites in Tg2576 mice suggest a mechanism of senile plaque formation and progression of neuritic dystrophy in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 108:435–442
50. Perl DP (2010) Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med* 77:32–42
51. Ramos B, Baglietto-Vargas D, Del Rio JC et al (2006) Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1xAPP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 27:1658–1672
52. Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, DeKosky ST, Mufson EJ (2007) Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology* 68:1501–1508
53. Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, Mufson EJ (2006) Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 27:1372–1384
54. Selkoe DJ (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298:789–791
55. Sokolow S, Henkins KM, Bilousova T et al (2011) AD synapses contain abundant Abeta monomer and multiple soluble oligomers, including a 56-kDa assembly. *Neurobiol Aging*. doi: [10.1016/j.neurobiolaging.2011.05.011](https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.05.011)
56. Stokin GB, Lillo C, Falzone TL et al (2005) Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science* 307:1282–1288
57. Su JH, Cummings BJ, Cotman CW (1993) Identification and distribution of axonal dystrophic neurites in Alzheimer's disease. *Brain Res* 625:228–237
58. Su JH, Cummings BJ, Cotman CW (1998) Plaque biogenesis in brain aging and Alzheimer's disease. II. Progressive transformation and developmental sequence of dystrophic neurites. *Acta Neuropathol* 96:463–471
59. Sze CI, Troncoso JC, Kawas C et al (1997) Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:933–944
60. Tampellini D, Gouras GK (2010) Synapses, synaptic activity and intraneuronal abeta in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 2:13
61. Terry RD, Masliah E, Salmon DP et al (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* 30:572–580
62. Vitorica J, Satrustegui J (1986) Involvement of mitochondria in the age-dependent decrease in calcium uptake of rat brain synaptosomes. *Brain Res* 378:36–48
63. Vossel KA, Zhang K, Brodbeck J et al (2010) Tau reduction prevents Abeta-induced defects in axonal transport. *Science* 330:198
64. Woodhouse A, Vickers JC, Adlard PA, Dickson TC (2009) Dystrophic neurites in TgCRND8 and Tg2576 mice mimic human pathological brain aging. *Neurobiol Aging* 30:864–874
65. Yang DS, Stavrides P, Mohan PS et al (2011) Reversal of autophagy dysfunction in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease ameliorates amyloid pathologies and memory deficits. *Brain* 134:258–277

66. Yu WH, Kumar A, Peterhoff C et al (2004) Autophagic vacuoles are enriched in amyloid precursor protein-secretase activities: implications for beta-amyloid peptide over-production and localization in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 36:2531–2540
67. Zempel H, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM (2010) Abeta oligomers cause localized Ca(2+) elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines. *J Neurosci* 30:11938–11950
68. Zhang XM, Cai Y, Xiong K et al (2009) Beta-secretase-1 elevation in transgenic mouse models of Alzheimer's disease is associated with synaptic/axonal pathology and amyloidogenesis: implications for neuritic plaque development. *Eur J Neurosci* 30:2271–2283

Anexo 7

Torres M, Jimenez S, Sanchez-Varo R, Navarro V, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Carmona I, Davila JC, Vizuite M, Gutierrez A, Vitorica J. (2012). Defective lysosomal proteolysis and axonal transport are early pathogenic events that worsen with age leading to increased APP metabolism and synaptic Abeta in transgenic APP/PS1 hippocampus. *Mol Neurodegener.*, 7:59.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Defective lysosomal proteolysis and axonal transport are early pathogenic events that worsen with age leading to increased APP metabolism and synaptic Abeta in transgenic APP/PS1 hippocampus

Manuel Torres^{1,2,3}, Sebastian Jimenez^{1,2,3}, Raquel Sanchez-Varo^{3,4}, Victoria Navarro^{1,2,3}, Laura Trujillo-Estrada^{3,4}, Elisabeth Sanchez-Mejias^{3,4}, Irene Carmona^{1,2,3}, Jose Carlos Davila^{3,4}, Marisa Vizuete^{1,2,3}, Antonia Gutierrez^{3,4*} and Javier Vitorica^{1,2,3*}

Abstract

Background: Axonal pathology might constitute one of the earliest manifestations of Alzheimer disease. Axonal dystrophies were observed in Alzheimer's patients and transgenic models at early ages. These axonal dystrophies could reflect the disruption of axonal transport and the accumulation of multiple vesicles at local points. It has been also proposed that dystrophies might interfere with normal intracellular proteolysis. In this work, we have investigated the progression of the hippocampal pathology and the possible implication in Abeta production in young (6 months) and aged (18 months) PS1(M146L)/APP(751s) transgenic mice.

Results: Our data demonstrated the existence of a progressive, age-dependent, formation of axonal dystrophies, mainly located in contact with congophilic Abeta deposition, which exhibited tau and neurofilament hyperphosphorylation. This progressive pathology was paralleled with decreased expression of the motor proteins kinesin and dynein. Furthermore, we also observed an early decrease in the activity of cathepsins B and D, progressing to a deep inhibition of these lysosomal proteases at late ages. This lysosomal impairment could be responsible for the accumulation of LC3-II and ubiquitinated proteins within axonal dystrophies. We have also investigated the repercussion of these deficiencies on the APP metabolism. Our data demonstrated the existence of an increase in the amyloidogenic pathway, which was reflected by the accumulation of hAPPfl, C99 fragment, intracellular Abeta in parallel with an increase in BACE and gamma-secretase activities. In vitro experiments, using APP_{swe} transfected N2a cells, demonstrated that any imbalance on the proteolytic systems reproduced the in vivo alterations in APP metabolism. Finally, our data also demonstrated that Abeta peptides were preferentially accumulated in isolated synaptosomes.

Conclusion: A progressive age-dependent cytoskeletal pathology along with a reduction of lysosomal and, in minor extent, proteasomal activity could be directly implicated in the progressive accumulation of APP derived fragments (and Abeta peptides) in parallel with the increase of BACE-1 and gamma-secretase activities. This retard in the APP metabolism seemed to be directly implicated in the synaptic Abeta accumulation and, in consequence, in the pathology progression between synaptically connected regions.

Keywords: Alzheimer's disease, PS1/APP transgenic model, Dystrophic neurites, Tau phosphorylation. Cathepsin activity, APP processing, Abeta production

* Correspondence: agutierrez@uma.es; vitorica@us.es

³Centro de Investigación Biomedica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain

¹Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Hospital Universitario Virgen del Rocío, Consejo Superior de Investigaciones Científicas Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain
Full list of author information is available at the end of the article

Background

Alzheimer's disease (AD) is a proteinopathy characterized by the accumulation of aggregated extracellular amyloid-beta (Abeta, A β) peptides and intracellular hyperphosphorylated tau (revised in [1]). Concomitant with appearance of extracellular Abeta deposits, another central pathological feature of the disease is the early formation of amyloid plaque-associated neuritic changes in the form of dystrophic neurites, together with a selective loss of connections and neuronal groups. Dystrophic neurites, defined as thickened or irregular neuronal processes, are considered to be expression of a widespread alteration of the neuronal cytoskeleton. In AD, dystrophic axons are particularly abundant in the hippocampal fiber systems originating from the subiculum, CA1, and the entorhinal cortex [2]. However the exact molecular mechanisms underlying the pathogenesis of AD remain to be elucidated.

Dystrophic neurites were characterized by the presence of numerous vesicles of multiple origins [3,4]. Several lines of investigation support the notion that defective autophagy process, a cellular catabolic mechanism essential for degradation of aggregated proteins and organelles, significantly contributes to AD pathogenesis [5-8]. Interestingly, autophagic compartments have been reported to participate in APP processing and A β peptides production [9].

Abeta peptides, cytotoxic in their oligomeric state [10-13] derive from the sequential cleavage of APP by beta- and gamma-secretases [14,15]. Although the exact intracellular localization of APP processing is unknown, the autophagic and endocytic pathways could be both involved in precursor protein (APP) processing and Abeta generation. In this sense, BACE-1 and gamma-secretase complex have been detected in many cellular locations, including early and late endosomes [16], autophagic vacuoles [17-19] and lysosomes [20]. On the other hand, the Abeta degradation, *in vivo*, could be mediated by several proteases, as neprilysin, IDE, and several cathepsins as B, D and E [21]. Abnormal processing of APP or Abeta accumulation in AD could be related to several mechanisms, including excessive production, abnormalities in transport, alteration of autophagic and endosomal pathways, and deficits in its degradation through the lysosome or the ubiquitin-proteasome system (UPS) [22-24]. In fact, accumulation of autophagic vacuoles (AVs) has been observed in brains from AD patients [3,19] and in PS1/APP mice after Abeta deposition [17,19,25]. Moreover, the AVs were principally accumulated within dystrophies and could reflect impairment in AVs clearance in AD brains [5]. In this sense it has been reported that enhancing lysosomal cathepsin activity ameliorates Abeta toxicity [26] and restoring the autophagy-lysosomal pathway (by

deletion of cystatin B) reduced amyloid load and rescued memory performance [9].

In the present work we investigated how the possible age-related relationship between aberrant Abeta generation and dysfunctions in axonal cytoskeleton as well as in lysosomal and proteasomal systems, manifested in our PS1/APP AD model. We proposed that the decrease in lysosomal proteolytic activities was implicated in increased Abeta production. Abnormal accumulation of Abeta could aggravate the axonal and cytoskeleton abnormalities linked to the pathology of AD.

Results

The age-dependent increase of neuritic dystrophies was paralleled by phosphorylation of cytoskeletal proteins and decrease in motor proteins

APP-positive dystrophic neurites represented an early pathology in our PS1/APP model [17]. These dystrophies were of axonal origin and, at early ages, were located exclusively surrounding congophilic Abeta plaques. It was also known that Abeta load increased with aging in this and most AD models [27]. Thus, we have first evaluated the progression of the APP-positive dystrophy formation from early (4-6 months) to late (12-18 months) ages. As expected, the number of APP-positive dystrophies, surrounding Abeta plaques, increased significantly in 12-18 month cohort (Figure 1A), paralleling the increase in plaque size and number (Figure 1A and [17]). Furthermore, according with previous data, the dystrophic neurites were predominantly concentrated surrounding the congophilic Abeta plaques at all ages.

The presence of aberrant hyperphosphorylated cytoskeletal proteins is one of the major pathological hallmarks of AD [28]. Furthermore, hyperphosphorylated neurofilaments and tau seemed to overlap with senile plaques in AD patients and models (unpublished data, see also [17,28,29]). Thus, hyperphosphorylated cytoskeletal proteins could also be implicated in the progression of the pathology in our PS1/APP model. To determine this possibility, we tested the neurofilaments (using SMI antibodies) and tau phosphorylation (AT8 and AT100 epitopes) in 6- and 18 months PS1/APP. As we described previously [17], 6-month-old PS1/APP mice displayed only minor modifications. In fact, as compared with age-matched WT mice, neurofilament (heavy and medium chains; H, M) phosphorylation (calculated as ratio between phospho and non-phosphorylated neurofilament) exhibited no apparent modifications at this age (see Figure 1B). Only the levels of AT8 epitope were slightly but significantly increased. However, 18-month-old PS1/APP mice displayed advance cytoskeletal pathology. As shown (Figure 1B), neurofilament heavy and medium chains were hyperphosphorylated (mostly due

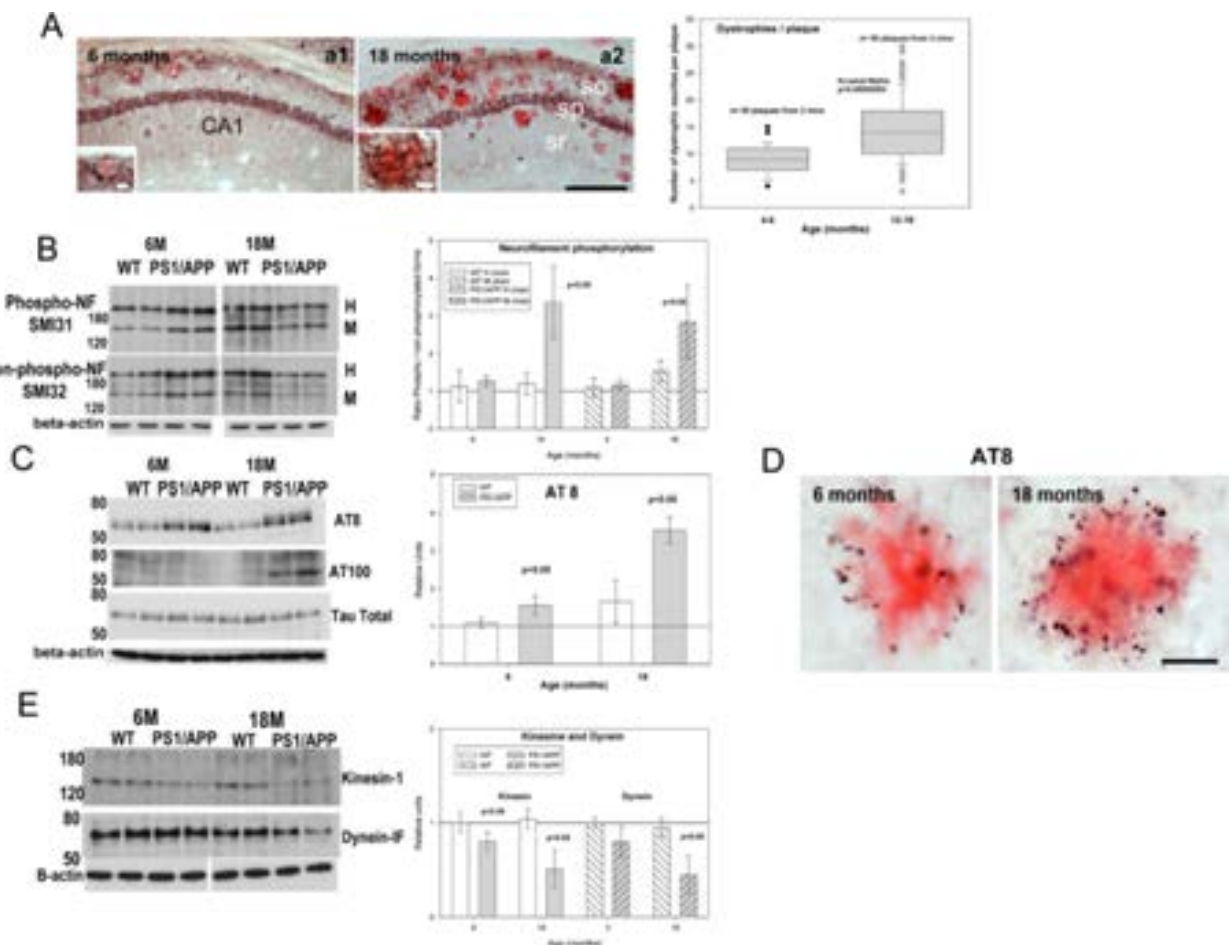


Figure 1 Aged-dependent increase of the hippocampal axonal pathology in PS1/APP mice. **A)** APP-immunolabeled CA1 sections with Congo red at 6 (left) and 18 (right) months of age showing the age-dependent increase in the dystrophic neurite pathology. Dystrophies were concentrated surrounding Abeta plaques (insets in a1 and a2 show higher magnifications). The quantitative analysis of plaque-associated dystrophies demonstrated a significant increase in aged mice. **B)** Representative western blots (n=5/age/group) for phosphorylated (upper panel) and non-phosphorylated (lower panel) neurofilament (SMI antibodies). Bands corresponding to high (H) and medium (M) chains were indicated. Quantitative analysis revealed an increase in the phosphorylated vs non-phosphorylated H and M neurofilaments in aged PS1/APP mice. No changes were observed in 6 month-old PS1/APP or WT mice. **C)** Tau phosphorylation was determined by western blots using AT8 (upper panel), AT100 (middle panel) and tau (lower panel) antibodies at 6 and 18 months of age (n=5/age/group). Graph showed the quantitative analysis of AT8 western blots. Due to the lack of immunoreactivity in WT and 6 months PS1/APP mice, the AT100 signal could not be quantified. A prominent increase in AT100 epitope (absent in other conditions) was observed in 18 month-old transgenic mice. **D)** AT8 immunostaining revealed that phospho-tau concentrated principally in dystrophies around congophilic plaques. **E)** Western blots and quantitative analysis (n=5/age/group) of kinesin (upper panel) and dynein (lower panel) expression. Both motor proteins decreased in PS1/APP mice. So, stratum oriens; sp, stratum pyramidale; sr, stratum radiatum. Scale bars: 200 μm (a1/a2), 10 μm (inset a1), 20 μm (inset a2), 20 μm (D).

to a decrease in the non-phosphorylated forms). In agreement with this observation, both AT8 and, more prominently, AT100 tau phosphoepitopes (Figure 1C) were increased in 18 month-old PS1/APP. The presence of hyperphosphorylated tau was further confirmed by immunohistochemistry. Tau-reactive (AT8) dystrophic neurites, localized surrounding amyloid plaques, were detected since early ages (Figure 1D).

To further evaluate whether microtubule vesicular transport might be compromised in PS1/APP mice, we

have assessed the levels of kinesin-1 and dynein motor proteins. As previously reported [17], 6 month-old PS1/APP mice showed a modest reduction on both proteins and, in accordance with the advance pathology, the levels of both motor proteins were dramatically reduced in 18 months PS1/APP mice (Figure 1E).

These data confirmed and extended our previous observation in this model, at early ages, and demonstrated the existence of a clear age-dependent axonal pathology implicating cytoskeletal and motor proteins.

The age-dependent progression of the neuritic pathology was associated to an impairment of proteolysis mechanisms

It has been reported that axonal dystrophy could be produced by inhibition of the lysosomal proteolysis [30,31] or by axonal transport deficiencies [32]. However, axonal transport was also essential for the correct lysosomal maturation and intracellular protein degradation [33]. Thus, the formation and the age-dependent increase in neuritic dystrophies could be cause or consequence of a progressive reduction of the intracellular proteolytic processes. Theoretically, an impairment on either proteasomal and/or autophagic/lysosomal route, in the PS1/APP model, should be reflected by the accumulation of ubiquitinated proteins and/or the autophagic marker LC3-II. In fact, our data (Figures 2A and B) clearly demonstrated the existence of a marked and early accumulation of both ubiquitinated proteins and LC3-II in hippocampal samples from PS1/APP mice. This accumulation was observed since early ages (6 months of age), increased significantly in aged PS1/APP mice (18 months) and was not observed at 2 months of age, before plaque deposition (not shown). On the contrary, WT mice displayed absolutely no changes at these ages. These data were further confirmed by immunohistochemistry experiments. As shown, (Figure 2C, c1 to c6), the LC3 immunoreactivity was principally located in the somata and apical dendrites of principal neurons whereas ubiquitin immunostaining (Figure 2D, d1 to d6) was mainly located at the cell bodies (see Figure 2D, d2 inset). Furthermore, most (if not all) Abeta plaques (stained with Congo Red) were surrounded by dystrophies, LC3 or ubiquitin immunopositive, both at 6 months and more patently at 18 months of age.

Although the accumulation of LC3-II could reflect both, induction in the autophagy route or decrease in the autophagosome degradation, the presence of ubiquitinated proteins in a similar localization of LC3, surrounding Abeta plaques, strongly suggested the existence of a decrease in autophagosome degradation. Among different causes, the decrease in autophagosome degradation could reflect a decrease in the lysosomal activity. Thus, we next evaluated the lysosomal and proteasomal activity by determining the cathepsins, B and D, activities and the proteasomal chymotrypsin-like activity. As shown (Figure 2E), both cathepsin B and D activities decreased since relatively early ages. Young (6 months) PS1/APP displayed a consistent ($-39.21 \pm 18.84\%$; $n=5$, $p<0.05$; $-44.15 \pm 13.51\%$, $n=3$, $p<0.05$; for cathepsin B and D, respectively) decrease (as compared with age matched WT) whereas 18 month-old PS1/APP mice displayed a further diminution ($-72.50 \pm 4.2\%$; $n=4$, $p<0.05$; -55.45 ± 6.7 , $n=3$, $p<0.05$, respectively). No changes were observed before plaque deposition (at 2 month-old,

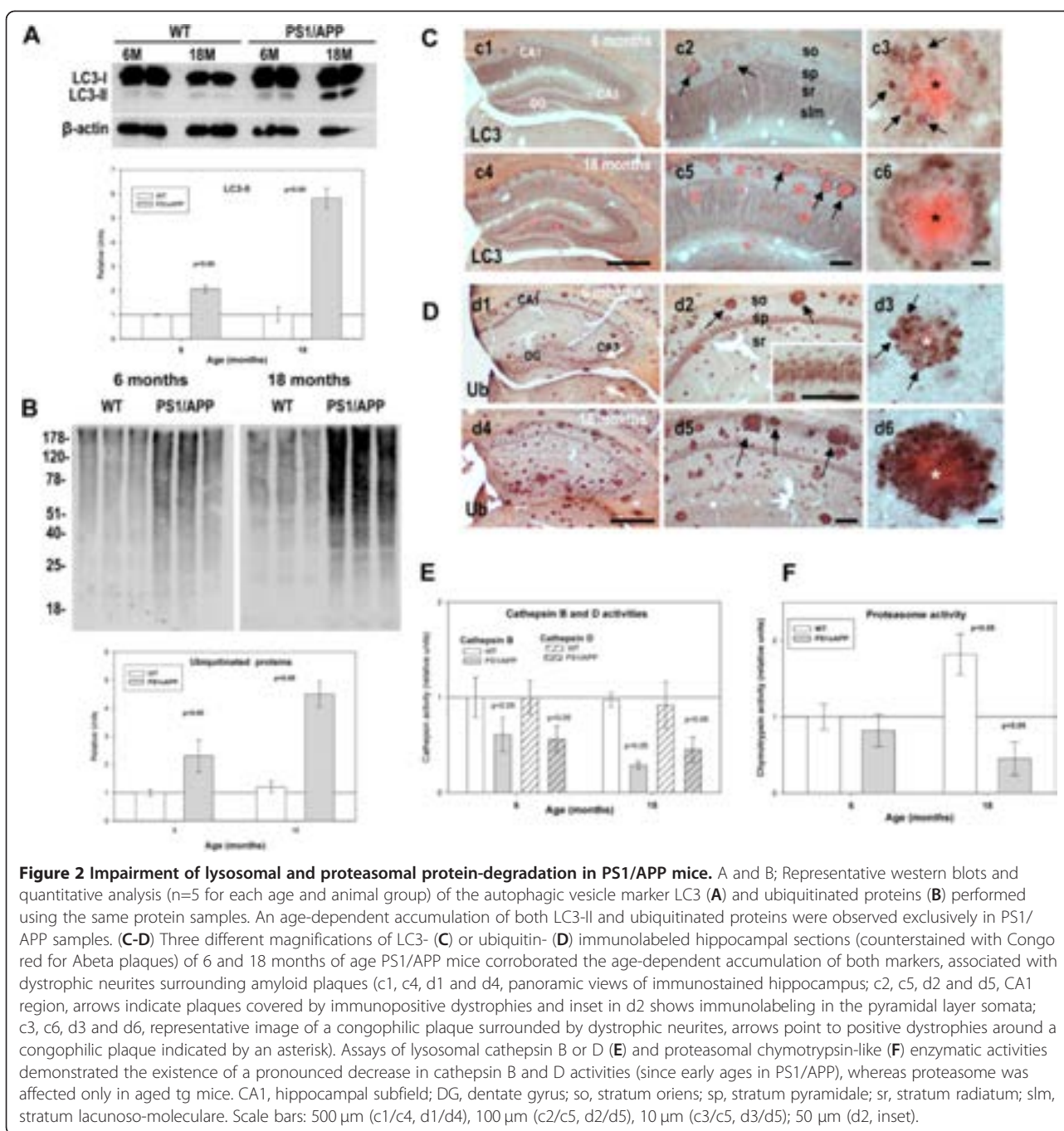
not shown). On the other hand, the proteasomal activity (Figure 2F) also displayed a slight, and not significant diminution at 6-months ($-20.4 \pm 12.3\%$, $n=4$) followed by a more pronounced inhibition in aged PS1/APP mice ($-45.5 \pm 15.6\%$; $n=4$; $p<0.05$). No differences between WT and PS1/APP were observed before the plaque deposition (2 months of age, not shown) and no inhibition was observed in 18 months WT mice.

Consistent with the decrease in lysosomal activity, we also observed a significant reduction in the mature forms of both cathepsins B and D in PS1/APP mice (Figures 3A and B) and an accumulation of the lysosomal protein lamp 1 (Figures 3C), at 6 and 18 months. Furthermore, this accumulation of lysosomal proteins seemed to be localized in dystrophies surrounding Abeta plaques, as demonstrated by immunohistochemistry analysis of lamp 2 protein (Figure 3D). These data revealed the existence of a lysosomal dysfunction in PS1/APP mice after plaque deposition. In this sense, it has been recently reported [6] that PS1 mutations affected the correct maturation of the V0a1 subunit of the vATP-ase and the lysosomal acidification. However, in our model, we observed an accumulation of the mature form of V0a1 protein (Figure 3E), similar to lamp 1 protein (compare Figures 3C and E). Furthermore, 6-month-old homozygous PS1M146L transgenic mice displayed no alterations on cathepsin B activity (not shown).

The amyloidogenic APP processing and both BACE-1 and gamma-secretase activities were increased in aged PS1/APP mice

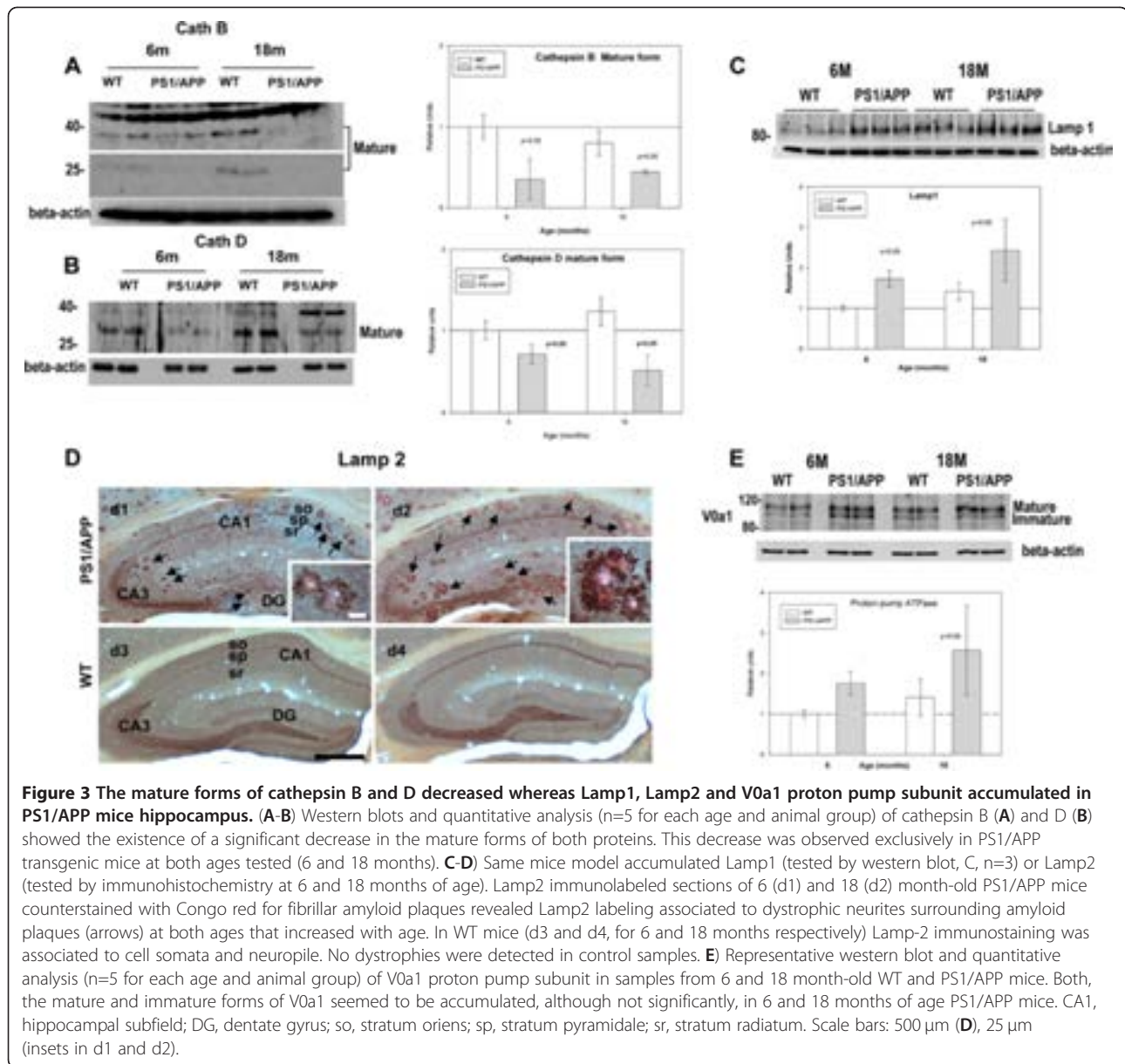
Data so far demonstrated the existence of a progressive age-dependent neuritic (probably axonal) pathology in the PS1/APP model that affected the intracellular proteolytic systems. We next evaluated whether this progressive pathology could affect the amyloidogenic APP processing. As shown (Figure 4A), the mature hAPPfl (visualized as two bands, corresponding with the mature and immature forms of the transgenic hAPP) significantly increased in the hippocampus of 18 month tg mice, as compared with 6 month-old animals (2.01 ± 0.04 ; $n=6$; $p<0.05$). Also, a significant increase in the ratio mature/immature form of the hAPP was observed (data not shown). However, no differences in mRNA expression of the transgenic hAPP were detected between 2 and 18 months (data were normalized to the expression levels observed in 6 months PS1/APP, $n=6$ for each age, 1.12 ± 0.15 , 1.0 ± 0.27 , 1.33 ± 0.29 and 1.23 ± 0.48 for 2, 6, 12 and 18 month PS1/APP, respectively).

The APP proteolytic fragments C83 (alpha-CTF) and C99 (beta-CTF) are products from alpha- or beta-secretase processing, respectively, and substrates for gamma-secretase complex. As also shown in Figure 4A, the levels of C99 showed a clear age-dependent increase,



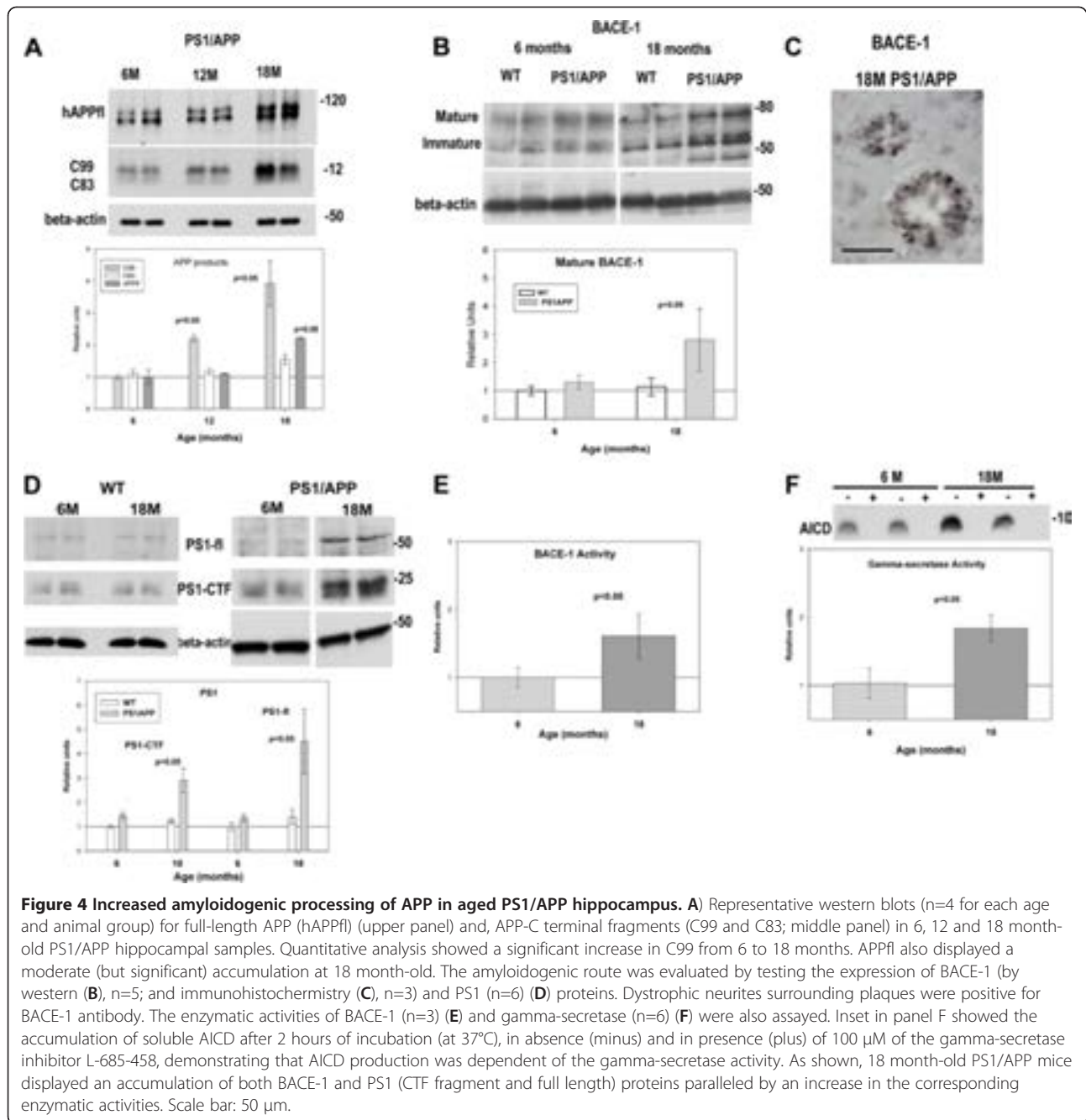
from 6 to 18 month in PS1/APP mice whereas C83 levels were low (respect to C99) and remained practically unaltered during aging (see also Figure 5). Together with the accumulation of APP and APP-fragments, we also observed an increase in the levels of both BACE-1 and PS1 proteins. As shown, Figure 4B, the mature (and immature) form of BACE-1 was increased in 18-month-old PS1/APP mice (as compared with 6 months) whereas no differences in mRNA levels were observed (data were

normalized by the expression of 6-month-old WT mice, n=5 for each age and genotype: 6 months: 1.00 ± 0.08 vs 0.88 ± 0.24 ; 12 months: $1.39 \pm .19$ vs 1.10 ± 0.12 ; 18 months: 1.29 ± 0.20 vs 1.33 ± 0.27 ; for WT and PS1/APP, respectively). As expected, BACE-1 was preferentially accumulated within dystrophies, surrounding Abeta plaques (Figure 4C). Furthermore, this alteration in BACE-1 level was also reflected by a higher BACE-1 enzymatic activity (Figure 4E). In parallel with these



observations, the PS1-ctf fragment and PS1fl (practically undetectable in WT and at early ages in PS1/APP mice, Figure 4D) were also accumulated in aged PS1/APP mice (Figure 4D), in absence of variation in the transgene expression (data were normalized to expression levels detected in 6 months PS1/APP, n=6 for each age, 1.06 ± 0.45 , 1.0 ± 0.69 , 1.33 ± 0.62 and 1.03 ± 0.82 for 2, 6, 12 and 18 month PS1/APP, respectively). Although gamma-secretase is a multimeric protein and the increase in a single subunit could not directly reflect a parallel increment in the mature complex, it is of note that PS1-terminal fragments were exclusively generated when PS1fl was incorporated into the mature complex (see

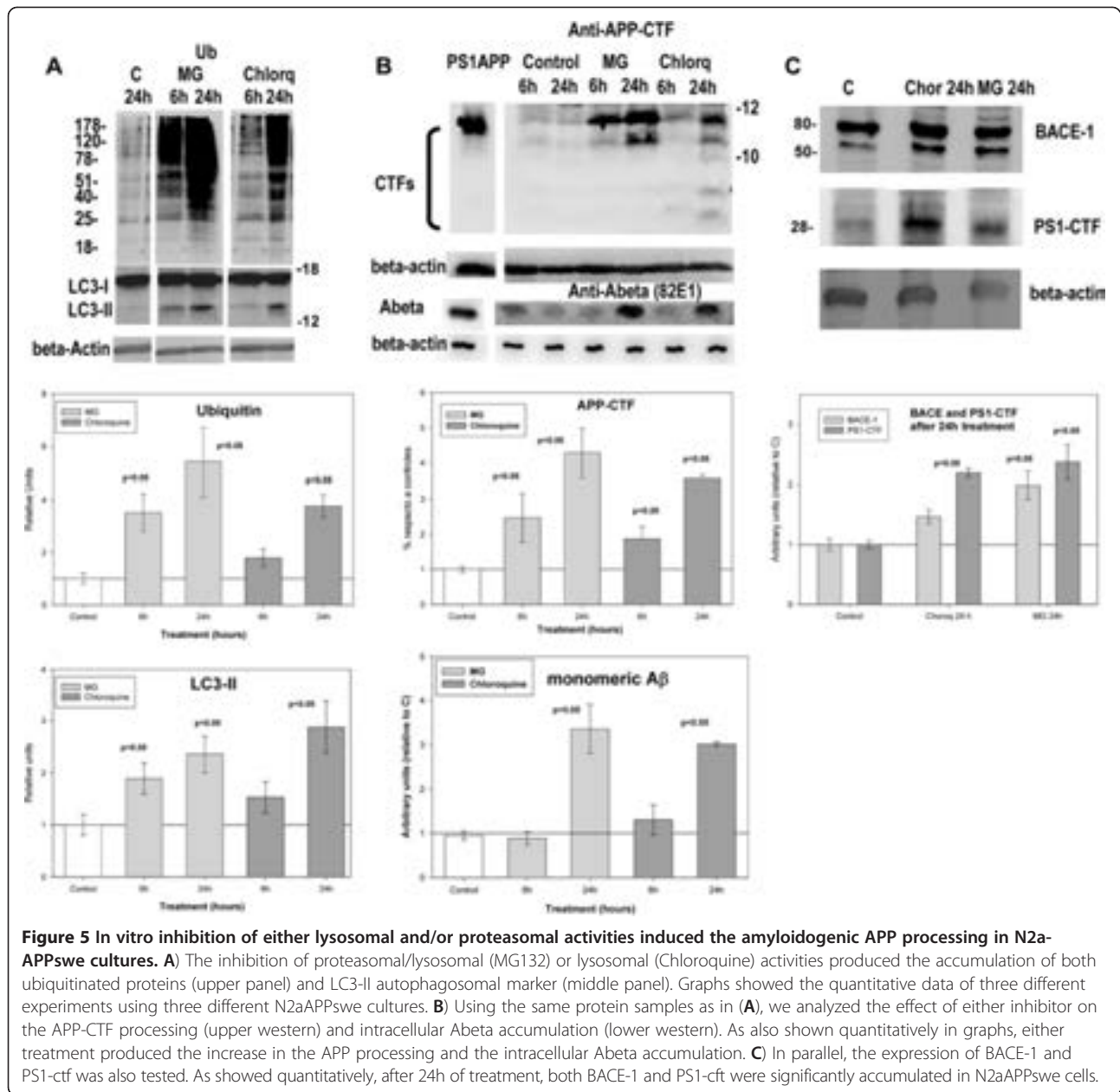
[34]). Thus, these data were consistent with an age-dependent increase in gamma-secretase. In fact, the gamma-secretase activity, determined as the rate of AICD production using fresh membranes isolated from different ages (in consequence, the substrate was the endogenous APP-CTF fragments, presented at each age) displayed a consistent increase in the aged PS1/APP samples (Figure 4F). It should be noted that, under these experimental conditions, we cannot discriminate if the increase in gamma-secretase activity was reflecting the accumulation of PS1-ctf or just an increase in substrate (C99 fragment, predominantly). Independently, the aged PS1/APP mice displayed an increased C99 processing capacity.



Inhibition of lysosome increased APP-processing and Abeta accumulation in N2aAPPsw cells

We next evaluated, *in vitro* using APP^{Swedish} transfected N2a cells [35], whether the APP metabolism was indeed affected by the inhibition of the intracellular proteolysis. For these experiments, the lysosomal or proteasomal/lysosomal activities were inhibited by the addition of Chloroquine (10 μM) or MG132 (5 μM). As expected, both lysosomal and/or proteasomal inhibition produced the accumulation of ubiquitinated proteins and the autophagosomal marker LC3-II (Figure 5A). Using the

same protein extracts, we next tested whether the inhibition of proteasomes and/or lysosomes was reflected by alterations of the APP metabolism. As shown, both inhibitors produced a clear accumulation of APP-CTFs in APP N2a cells. In fact, C99 fragment and, more relevant, intracellular monomeric Abeta were accumulated after either treatment (Figure 5B). Furthermore, we also observed a parallel accumulation of BACE-1 and PS1-cft protein (Figure 5C). Therefore, these *in vitro* experiments demonstrated that the inhibition of lysosomal or proteasomal degradation processes produced the



accumulation of APP fragments and Abeta production, in parallel with BACE-1 and PS1-ctf proteins. These data demonstrated that any misbalance in the correct intracellular proteolysis could induce the accumulation of APP products and, in consequence, increased the production of Abeta peptide.

Age-dependent increase in Abeta accumulation in isolated presynaptic terminals (synaptosomes)

Finally, we also tested whether the observed age-dependent deficiencies in cytoskeletal proteins, lysosomal activity and APP-metabolism were reflected by modification of the APP fragment distribution in

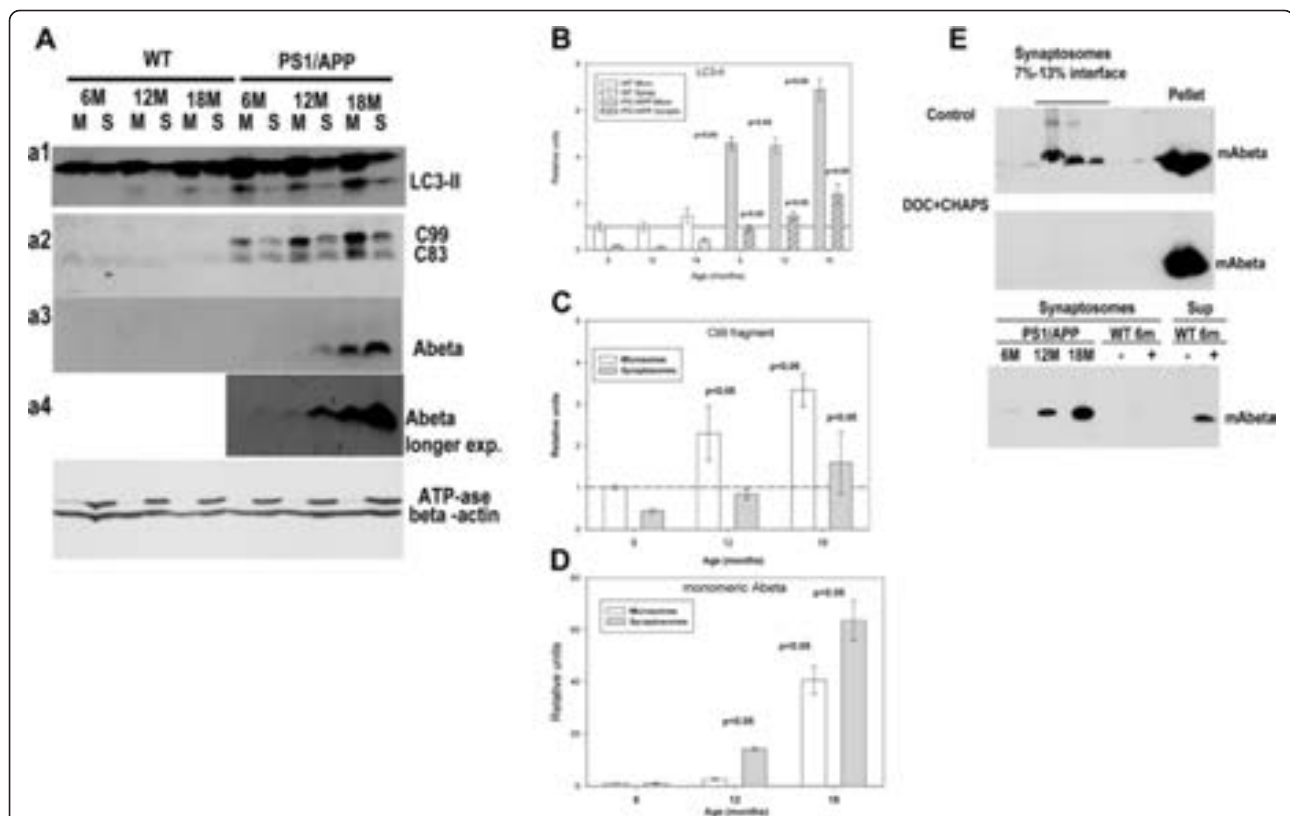
isolated synaptosomes. If the neuritic pathology in this model was predominantly, although not exclusive, of axonal origin, the observed modifications should produce the accumulation of APP-derived peptides (including Abeta) at the presynaptic terminals. In fact, we have recently reported the existence of presynaptic terminals containing multiple autophagic vesicles in PS1/APP mice [17]. To test this possibility, the homogenates were fractionated into microsomal and synaptosomal fractions. The microsomal fraction contained a heterogeneous population of vesicles of different origins whereas synaptosomes were principally enriched in presynaptic terminals.

We first compared the distribution of LC3-II protein, as a marker of autophagosomes, between microsomes and synaptosomes. As shown (Figure 6A, a1), in WT mice the LC3-II was abundant in microsomes whereas it was scarce in synaptosomes at any age tested (see also [17]). As expected, the LC3-II levels were higher in PS1/APP mice, as compared with WT, and increased with age in both fractions (Figures 6A and B). Thus, these data indicated the accumulation of autophagic vesicles at the presynapses [17] and also corroborated the existence of transport defects in PS1/APP mice.

We next analyzed the distribution of APP CTFs (C99 and C83) and Abeta between both fractions (Figure 6A, a2-4). Although the level of C99 increased clearly with age (in agreement with our previous data), the C99 content was patently higher in microsomes than in the synaptosomal fraction. This preferential distribution was

in agreement with the accumulation of BACE-1 in dystrophic neurites (Figure 4C) and the relative abundance of BACE-1 in microsomes (vs synaptosomes, data not shown). However, in spite of the large C99 accumulation, the monomeric Abeta peptide was scarce in microsomes and was preferentially accumulated at the synaptosomal fractions. It is noteworthy that, at early ages, synaptosomes accumulated low amount of monomeric Abeta (see Figures 6 a3, a4, D and E), whereas, at late ages, the monomeric Abeta peptide was highly concentrated at the synaptosomal fractions (63.6±7.5 fold as compared with 6 months, n=4; Figure 5D).

It could be argued that synaptosomal Abeta were of extracellular origin, due to contamination with plaques or by internalization during homogenization. To ascertain the intrasynaptosomal origin we have first tested whether the Abeta in the synaptosomal fractions was due to plaque



contamination. As shown in Figure 6E (upper panels), the disruption of cellular membranes and the formation of synaptosomes, by homogenization of the tissue in presence of mild detergents (CHAPS plus deoxycholate), completely avoided the presence of Abeta on the synaptosomal fractions of the Ficoll-gradients. Second, the possible extracellular origin of Abeta, due to its compartmentalization on synaptosomes during homogenization, was tested by adding synthetic monomeric Abeta42 to WT samples in the homogenization buffer. As shown, Figure 6E lower panel, the synthetic Abeta was not recovered on the synaptosomal fractions of WT mice whereas it was clearly detectable on the soluble fractions. These control experiments demonstrated the intrasynaptosomal origin of Abeta.

Discussion

In this work, we studied the progression of hippocampal neuronal pathology, in the PS1M146L/APP751SL model, that connects cytoskeleton and protein degradation dysfunction with dystrophy formation and synaptic Abeta production. As we reported previously, this model displayed the formation of axonal dystrophies, associated to extracellular Abeta deposition since early ages [17]. These dystrophies accumulated numerous vesicles of, among different origins, autophagic/lysosomal nature. Also, the axonal pathology was associated with the presence of aberrant presynaptic terminals in close proximity to Abeta plaques. In agreement with others [36-38] we observed that extracellular Abeta, probably by increasing the local calcium concentration, might produce cytoskeletal abnormalities that could induce transport defects (see also [39-43]). In fact, data presented in this work demonstrated the existence of a progressive increase in neurofilaments and tau hyperphosphorylation (SMI31, AT8 and AT100 epitopes). This increase was prevalently observed in dystrophies, surrounding the Abeta plaques. In conjunction with this apparent cytoskeletal dysfunction, we also observed a decrease in the levels of kinesin and dynein motor proteins. Taken together, these data strongly suggest the existence of a progressive, age-dependent, disorganization of the axonal cytoskeleton, which could impair the normal axonal transport, at local points in contact with extracellular Abeta deposits, (see also [25,43]). Furthermore, our data also demonstrated the accumulation of LC3-II and ubiquitinated proteins, principally at dystrophies. Whereas these observations could be interpreted as a simple accumulation of autophagosomes/lysosomes due to transport defects, our data also demonstrated the existence of a marked inhibition of the intracellular proteolytic activities. In fact, we observed a profound decrease in the cathepsin B and D activities and, in a minor extent, the proteasomal chymotrypsin activity. In parallel, we also observed a reduction in the mature forms of both cathepsins B and D

in PS1/APP samples. The reasons that determined this marked and early proteolytic inhibition are unknown. It has been proposed that FAD mutations in PS1 impaired the maturation of V0a1 subunit of the vATP-ase [6]. However, as mentioned (see results), in our model, the V0a1 subunit displayed no apparent defects on its maturation. Furthermore, 6-month-old PS1M146L transgenic mice displayed no variations on cathepsin B activity. Thus, the observed decrease in cathepsin B and D activities seemed to be independent of the proton pump maturation (see also [44]). Nevertheless, our data were indeed compatible with defects on lysosomal acidification and/or maturation. In this sense, it has been also proposed that axonal transport was crucial for lysosomal maturation and function [33]. Thus, in our AD model, the cytoskeletal disorganization (probably mediated by extracellular Abeta and calcium misbalance) could also impair the lysosomal maturation (reflected by a decrease in the mature forms of both cathepsins tested) and, in consequence, the proteolytic function (decrease in the cathepsin activities). Further experiments should be done to ascertain this point.

We also analyzed the consequences of this neuritic pathology on APP processing and Abeta generation. In this sense, the overexpression of cathepsin B [45], the enhancement of cathepsin activities [9] or the positive lysosomal modulation [26] reduced the Abeta accumulation, the synaptic deficiencies and restored the cognitive function in transgenic mice. Thus, the progressive decrease of cathepsin activities and, in a minor extent, proteasomal activity, observed in our model, could be paralleled by an increase in the amyloidogenic APP processing. In fact, the observed age-dependent accumulation of hAPPfl and C99, together with the increase in BACE-1 and PS1-ctf proteins and their enzymatic activities, confirmed this proposition. Furthermore, our *in vitro* experiments also corroborated the rapid and progressive accumulation of APP derived C-terminal fragments, intracellular Abeta and both BACE-1 and PS1-ctf proteins after lysosomal and/or proteasomal inhibition (see also [46,47]). Therefore, based on these data, it is tempting to speculate that the formation of axonal dystrophies, probably due to the presence of extracellular Abeta [48], might produce a decrease in the intracellular proteolysis. This was paralleled by the accumulation of APP derived fragments inducing, in consequence, the production of higher amount of Abeta peptides (see also [49]). This self-progressing pathological scenario could be implicated in the progressive increase of Abeta and BACE-1 observed in AD patients (data not shown; see also [50]) and in the expansion of the pathology (see below).

Of note, our data also demonstrated the existence of a preferential accumulation of Abeta peptides in isolated synaptosomal fractions. Whereas this preferential accumulation could reflect the high gamma-secretase activity at the presynaptic terminals (data not shown but see [51]), these data also indicated that Abeta peptides were produced in compartment(s) different to, or in addition to, the autophagic vesicles [52]. This proposition was based on the observation that LC3-II, an autophagic marker, was preferentially concentrated in the microsomal fractions and it was scarce in synaptosomes. Although autophagic vesicles were indeed concentrated in pathological presynaptic terminals [17], the clear disproportion between LC3-II and Abeta in microsomes and synaptosomes, at all ages tested, strongly indicated a different compartmentalization. In this sense, it has been recently proposed that Abeta was synaptically produced and secreted from endosomal compartment [53]. Independently of the intracellular compartment, the synaptic production of Abeta peptides, observed in this work, could be implicated in the synaptic dysfunction in AD patients and in the pathological progression between synaptically connected areas. In this sense, it is widely accepted that the severity of the disease correlated better with the synaptic dysfunction rather than the plaque load. Thus, the age-dependent accumulation and, probably, release of Abeta peptides by presynapses could be directly implicated in the dendritic spine alterations observed in AD patients and in AD models. Furthermore, recent publications have been highlight the progression of Abeta [54,55] and tau [56,57] pathology between synaptically connected regions. In this sense, we have also reported the existence of a preferential Abeta deposition, microglial activation and neurodegeneration of principal neurons in layers V-VI of the entorhinal cortex [58]. However, these particular pyramidal cells did not express the transgenic hAPP and, in consequence, did not produce Abeta peptides. Thus, the presynaptic accumulation of Abeta peptides, reported here, might be implicated in the Abeta deposition and pathological spreading from Abeta producing region/layer into other brain regions.

In sum, our data demonstrated the existence of a progressive, age-dependent, cytoskeletal pathology (probably due to the extracellular Abeta deposition) that could be implicated in a reduction of the intracellular proteolytic processes. This impairment was associated to a progressive accumulation of APP derived fragments (and Abeta peptides) according with the increase of BACE-1 and gamma-secretase activities. This retard in the APP metabolism seemed to be directly implicated in the synaptic Abeta accumulation and, in consequence, in the pathology progression between synaptically connected regions.

Methods

Transgenic mice

Generation and initial characterization of PS1M146L/APP751sl (PS1/APP) tg mice has been reported previously [10,58,59]. Heterozygous PS1/APP double tg mice (C57BL:6 background) were generated by crossing homozygous PS1 tg mice with heterozygous Thy1-APP751SL mice. Only male mice were used in this work. Age-matched non-transgenic male mice (WT) of the same genetic background (C57BL:6) were used as controls.

Mice were first anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg), the hippocampi were dissected and immediately frozen and stored at -80°C until use. For immunohistochemistry, anesthetized mice were perfused transcardially with a paraformaldehyde-based solution (see details below). All animal experiments were performed in accordance with the guidelines of the Committee of Animal Research of the University of Seville (Spain) and the European Union Regulations.

RNA and total protein extraction

Total RNA from mice hippocampi or cultured cells was extracted using Tripure Isolation Reagent (Roche) as described previously [10,11,27,58,59]. After isolation, RNA integrity was assessed by agarose gel electrophoresis. The yield of total RNA was determined by measuring the absorbance (260:280 nm) of isopropanol-precipitated aliquots of the samples. The recovery of RNA was comparable in all studied groups (1.2-1.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of tissue).

The protein pellets, obtained using the Tripure Isolation Reagent and isopropanol-mediated precipitation, were resuspended in 4% SDS and 8M urea in 40 mM Tris-HCl, pH 7.4 and rotated overnight at room temperature to get complete protein solubilization.

Reverse transcription and real-time RT-PCR

Retrotranscription (RT) was performed using random hexamers, 4 μg of total RNA as template and High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) following the manufacturer recommendations [10,27]. For real time RT-PCR, commercial Taqman™ probes (Applied Biosystems) were used for amplification. Alternatively, SYBRgreen dye and designed specific primers were used for amplification of human APP751 (forward: 5'-GGATATGAAGTTCATCATCA-3'; reverse: 5'-TCACTGTCGCTATGACAACA-3'), and human PS1 (forward: 5'-TGGCTCATCTTGGCTGTG-3'; reverse: 5'-ACCAGCATAACGAAGTGG-3'). PCR reactions were carried out using either ABI Prism 7000 or 7900HT sequence detector systems (Applied Biosystems). A standard curve was first constructed for every assay, using increasing amounts of cDNA. In all cases, the slope of the curves indicated optimal PCR conditions (slope 3.2-3.4). The cDNA levels of the different mice were determined

using GAPDH as housekeeper. Therefore, GAPDH amplification was done in parallel with the gene to be analyzed, and this data used to normalize target gene results.

Independent of the analyzed gene, results were always expressed using the comparative Ct method, following the Bulletin number 2 from Applied Biosystems. As a control condition, we selected 6-month-old WT mice. In consequence, the expression of all tested genes, for all ages and mouse strains, was referenced to the expression levels observed in 6-month-old WT mice.

Western blot

Western blots were performed as described [60]. Briefly, 5–20 μ g of proteins from the different samples were loaded on 16%-SDS-tris-tricine-PAGE or 12%-SDS-tris-glycine-PAGE and transferred to nitrocellulose (Hybond-C Extra; Amersham).

After blocking, using 5% non-fat milk, membranes were incubated overnight, at 4°C, with the appropriate antibody: phospho-neurofilament (clone SMI-31; 1:1,000; Abcam), total-neurofilament (clone SMI-32; 1:1000; Abcam), phospho-Ser199:202-Thr205-PHF-tau (clone AT8; 1:1000; Pierce), phospho-Thr212-Ser214-PHF-tau (clone AT100; 1:1,000; Innogenetics), kinesin-1 heavy chain (1:1,000; Abcam), dynein-1 intermediate chain (1:1000; Millipore), ATP-synthetase-Beta (1:1000; BD Transduction Laboratories), Abeta peptide (clone 6E10; 1:5000; Signet), APP C-terminal (1:6000; Calbiochem), PS1 C-terminal (1:2000; Millipore), BACE-1 (1:1000; Abcam), V0a1-proton-pump subunit (1:1000; Synaptic Systems), LC3B (1:1000; Cell Signaling), cathepsin B (1:1000, Santa Cruz); cathepsin-D (1:5000; ABFrontier Co. Ltd), Lamp-1 (1:1000; Developmental Studies Hybridoma Bank; University of Iowa), ubiquitin (1:1000; Sigma-Aldrich) and Beta-actin (1:5000; Sigma-Aldrich). Membranes were then incubated with the corresponding horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibody (Dako, Denmark) at a dilution of 1:8000. Each blot was developed using the ECL-plus detection method (Amersham).

For quantification, the scanned (Epson 3200) images were analyzed using PCBAS program. For normalization purposes, proteins were first estimated by Lowry and protein loading corrected by beta-actin. The intensity of bands from 6-month-old WT or PS1/APP (Figures 4A, E and F; Figures 5C and D) mice were averaged and considered as 1 relative unit. All other data were then normalized by the specific signal observed in 6-month-old WT or PS1/APP group or negative control for “in vitro” experiments.

Enzymatic activity determination

BACE-1, Cathepsin B and D activities were determined using commercial kits (R&D Systems, Germany;

Calbiochem, Germany and Sigma-Aldrich, respectively) following the manufacturer instructions. Briefly, fresh hippocampal samples were homogenized in the buffer supplied by the manufacturer or in PBS (for proteasome activity), centrifuged at 10,000xg (15 min at 4°C) and the supernatant (100–200 μ g of protein per assay) was used. BACE-1 and cathepsin B and D activities were determined using substrates provided by the manufacturer

Proteasome chymotrypsin-like activity was determined as described [61]. Briefly, soluble fractions (30–50 μ g of protein per assay) were diluted in 50 μ M reaction substrate Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-aminomethylcoumarin (AMC) (Sigma-aldrich), 0.1mM EDTA, 5mM DTT, 0.01% (w:v) CHAPS; 100mM NaCl; 1% (v:v) Glycerol, 50mM HEPES-KOH pH 7.5. Duplicated reactions were placed in a 96-well black polystyrene microplate (BD Transduction Labs.) and incubated at 37°C. Fluorescence was determined at excitation 360-380nm and emission 460-480 nm.

For each enzymatic assay, the fluorescence intensity was determined every 15 minutes (starting by the addition of the substrate) for a 1–2 hours final incubation time, using a Synergy HT Multi-mode microplate reader (Biotek). The activities were calculated from the maximal slope of the fluorescence intensity vs time curves and corrected by the amount of protein added. The results were then normalized by the activity observed in 6 months WT mice or 6 months PS1/APP mice (for BACE-1).

Also for each enzymatic activity, a reaction without substrate, a reaction without sample, and reaction with an inhibitor were used as negative controls. The inhibitors used were: Cathepsin B, Inhibitor Ref. 219385 (Calbiochem); Cathepsin D, pepstatin A Solution Ref. P3749 (Sigma-Aldrich); Proteasome 10 μ M MG-132 (Sigma-Aldrich). Independently of the enzymatic activity assay, each experiment was repeated, at least, three times for each age and genotype.

Gamma-secretase activity was determined following previously described protocols with some modifications [62]. Briefly, membrane pellets from PS1/APP animals (n=6 per age) were thawed and resuspended (at 3 mg of protein per ml) in 150 mM Citrate Buffer, pH 6.4, containing protease inhibitors (Roche). Aliquots (150 μ g of proteins) were used for each assay. As negative control, 100 μ M L-685-458 gamma-secretase inhibitor (Calbiochem) was added prior assay. Samples were then incubated, at 37°C with orbital shaking at 400 rpm, for 2 hours. After incubation, membranes were sonicated (at 80 W for 30 seconds) and centrifuged at 30,000xg (30 minutes, 4°C). Supernatants were used to determine AICD production by western blot using anti-APP C-terminal as primary antibody.

Tissue preparation for immunohistochemistry

After anesthesia with sodium pentobarbital (60 mg/kg), 6, 12, and 18-month-old control (WT) and PS1/APP tg male mice (n=4/age/genotype) were perfused transcardially with 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4 followed by 4% paraformaldehyde, 75 mM lysine, 10 mM sodium metaperiodate in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4. Brains were then removed, post-fixed overnight in the same fixative at 4°C, cryoprotected in 30% sucrose, sectioned at 40 µm thickness in the coronal plane on a freezing microtome and serially collected in wells containing cold PBS and 0.02% sodium azide. All animal experiments were approved by the Committee of Animal Use for Research of the Malaga University (Spain) and the European Union Regulations.

Immunohistochemistry

Coronal free-floating brain sections (40 µm thick) from 6 and 12–18 month-old control (WT) and PS1/APP mice were processed simultaneously in the same solutions and conditions to prevent processing variables. Sections were first treated with 3% H₂O₂/3% methanol in PBS and with avidin-biotin Blocking Kit (Vector Labs, Burlingame, CA, USA), and then incubated overnight at room temperature with one of the following antibodies: anti-APP-C-terminal rabbit polyclonal (1:20,000; Sigma-Aldrich), anti-phospho-Ser199:202:Thr205-PHF-tau mouse monoclonal (clone AT8; 1:500; Pierce) anti-ubiquitin rabbit polyclonal (1:2,000, Dako), anti-LC3 goat polyclonal (1:1,000, Santa Cruz Biotechnology), anti-BACE-1 rabbit polyclonal (1:1,000, Abcam) or anti-Lamp2 rabbit polyclonal (1:500, Abcam).

The tissue-bound primary antibody was detected by incubating with the corresponding biotinylated secondary antibody (1:500 dilution, Vector Laboratories), and then followed by streptavidin-conjugated peroxidase (Sigma Aldrich) diluted 1:2000. The reaction was visualized with 0.05% 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma Aldrich), 0.03% nickel ammonium sulphate and 0.01% hydrogen peroxide in PBS. When required, immunolabeled sections were then incubated for 3 minutes in a solution of 20% Congo red. Sections were then mounted on gelatin-coated slides, air dried, dehydrated in graded ethanols, cleared in xylene and coverslipped with DPX (BDH) mounting medium. Specificity of the immune reactions was controlled by omitting the primary antiserum.

Quantitative analysis of Abeta plaques-associated dystrophic neurites

The number of APP-immunopositive dystrophic neurites per plaque was quantified over Congo red stained Abeta deposits in sections from PS1/APP animals at young (4 and 6 month-old group) and old (12 and 18 months-old group) ages (n= 6/group; 5 sections per animal

through the antero-posterior extent of the hippocampus). Quantification was done in CA1 subfield which was defined using a 10x objective and the number of dystrophic neurites was counted using a 100x objective in an Olympus BX61 microscope equipped with NewCAST software package (Olympus, Glostrup, Denmark). All plaques present in the CA1 region of each section were quantified. The number of dystrophic neurites per plaque was normalized to the mean plaque area to allow comparisons between groups.

Synaptosome and microsomal fractions isolation

Synaptosomal fractions were obtained basically as described previously [17,63]) with some modifications. Briefly, one mouse hemicortex was gently homogenized with a glass Dounce homogenizer in cold Buffer A (0.32 M sucrose, 1 mM EDTA, 1mM EGTA in 20 mM Tris-HCl pH 7.5, plus 1mM sodium orthovanadate, 50 mM sodium fluoride and a complete protease inhibitor cocktail (Roche) at a ratio of 40-50 mg of tissue per ml of buffer. This homogenate was first centrifuged at 1500 g and the post-nuclear supernatant was again centrifuged at 12,600 g for 20 minutes at 4°C to get the crude synaptosomes fraction. This pellet was resuspended in 13% (w:v) (final concentration) Ficoll PM400 (in buffer A) and layered on the bottom of a discontinuous gradient, composed by buffer A and 7% Ficoll (in buffer A). The gradient was centrifuged at 100,000g (45 minutes, 4°C) in a TLS-55 swimming bucket rotor (Beckman-Coulter), and synaptosomes were isolated at the 7.5–13% interface. After washing (twice with buffer A), the pellet of synaptosomes was resuspended in Buffer A. The possible contamination with vacuolated postsynapses was evaluated by testing the presence of tau (presynaptic) and MAP2 (postsynaptic) proteins. Results (not shown) indicated the existence of a minimal contamination with vacuolated postsynapses.

On the other hand, the microsomal fraction was obtained after additional centrifugation of the 12,600 g supernatant at 100,000 g (1 hour, 4°C) in a TLA-110 rotor (Beckman-Coulter). The pellet of microsomes was also resuspended in Buffer A. The protein content of the both synaptosomal and microsomal fractions was determined by Lowry.

APPswe-expressing N2a cultures

APPswe-stably transfected Neuroblastoma cells were generously donated by Dr. Gopal Thinakaran (University of Chicago) [35]. N2aAPPswe cells were cultured in high glucose DMEM-Optimem (50%-50%) supplemented with 2 mM glutamine and 5% fetal bovine serum (PPA Company), in presence of Penicillin and Streptomycin (100 units/ml and 0.01 mg/ml respectively) and G418 (PPA Company) as clonal selection antibiotic (0.2 µg/ml)

[35]. For cell drug treatments, a 0.2 μ m filtered stock solution of Chloroquine diphosphate salt (Sigma-Aldrich) or MG132 (Sigma-Aldrich) were diluted in the same media at a final concentration of 10 or 5 μ M, respectively. This media was kept for 6 or 24 hours before collecting the cells and isolating RNA and protein as described above.

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SD. The comparison between two mice groups (WT and PS1/APP mice) was done by *t* test. For comparison between several age groups, we used one-way ANOVA followed by Tukey post hoc multiple comparisons test (Statgraphics plus 3.1). As stated above, for most experiments, the different xgroups were compared with 6-month-old WT mice. In some cases (Figures 4A, E and F; Figure 5C and D) 6-month-old PS1/APP mice were used as reference. The significance was set at 95% of confidence.

Abbreviations

AD: Alzheimer disease; APP: Amyloid Precursor Protein; A β : Amyloid β -protein; BACE-1: Beta-Secretase-1; CTF: Carboxyl-Terminal-Fragment; LC3: Microtubule-Associated Protein Light Chain 3; PS1: Presenilin-1.

Competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MT, SJ, IC, VN and MV carried out the molecular experiments; R S-V, L T-E, and E M-S carried out the immunohistochemical experiments, JCD and MV participated in the design of experiment and revising the manuscript, AG and JV design the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by grants PS09/00151 (to JV) and PS09/00099 (to AG) from Fondo de Investigación Sanitaria (Instituto de Salud Carlos III, Spain), by grants CTS-4795 (to JV) and SAS PI-0496/2009 (to AG) from Junta de Andalucía (Spain) and by CIBERNED grant PI2010/08 (to JV and AG). MT, SJ and RS-V were the recipients of a contract from CIBERNED. VN was the recipient of a PhD fellowship granted by the Spanish FPI Program ES-M and LT-E held a PhD fellowship from the Spanish FPU Program. We thank Dr. G. Thinakaran for the generous gift of transfected N2a-APPswe cells.

Author details

¹Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Hospital Universitario Virgen del Rocío, Consejo Superior de Investigaciones Científicas Universidad de Sevilla, c/ Manuel Siurot s/n, 41013 Sevilla, Spain. ²Department Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla 41012, Spain. ³Centro de Investigación Biomedica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain. ⁴Department Biología Celular, Genética y Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Málaga 29071, Spain.

Received: 2 August 2012 Accepted: 4 November 2012

Published: 22 November 2012

References

1. Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA: **Alzheimer Disease.** *Dis Mon* 2010, **56**:484–546.
2. Su JH, Cummings BJ, Cotman CW: **Identification and distribution of axonal dystrophic neurites in Alzheimer's disease.** *Brain Res* 1993, **625**:228–237.
3. Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, et al: **Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study.** *J Neuropathol Exp Neurol* 2005, **64**:113–122.
4. Nixon RA: **Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease.** *J Cell Sci* 2007, **120**:4081–4091.
5. Boland B, Kumar A, Lee S, Platt FM, Wegiel J, Yu WH, et al: **Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease.** *J Neurosci* 2008, **28**:6926–6937.
6. Lee JH, Yu WH, Kumar A, Lee S, Mohan PS, Peterhoff CM, et al: **Lyosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by alzheimer-related ps1 mutations.** *Cell* 2010, **141**:1146–1158.
7. Nixon RA, Yang DS: **Autophagy failure in Alzheimer's disease—locating the primary defect.** *Neurobiol Dis* 2011, **43**:38–45.
8. Nixon RA, Yang DS: **Autophagy failure in Alzheimer's disease—locating the primary defect.** *Neurobiol Dis* 2011, **43**:38–45.
9. Yang DS, Stavrides P, Mohan PS, Kaushik S, Kumar A, Ohno M, et al: **Reversal of autophagy dysfunction in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease ameliorates amyloid pathologies and memory deficits.** *Brain* 2011, **134**:258–277.
10. Jimenez S, Baglietto-Vargas D, Caballero C, Moreno-Gonzalez I, Torres M, Sanchez-Varo R, et al: **Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's Disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic.** *J Neurosci* 2008, **28**:11650–11661.
11. Jimenez S, Torres M, Vizuete M, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Trujillo-Estrada L, et al: **Age-dependent accumulation of soluble amyloid beta oligomers reverses the neuroprotective effect of soluble amyloid precursor protein-alpha (sAPPalpha) by Modulating Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Akt-GSK-3beta pathway in Alzheimer mouse model.** *J Biol Chem* 2011, **286**:18414–18425.
12. Lee EB, Leng LZ, Zhang B, Kwong L, Trojanowski JQ, Abel T, et al: **Targeting amyloid-beta peptide (Abeta) Oligomers by passive immunization with a conformation-selective monoclonal antibody improves learning and memory in abeta precursor protein (APP) transgenic mice.** *J Biol Chem* 2006, **281**:4292–4299.
13. LaFerla FM, Green KN, Oddo S: **Intracellular amyloid-[beta] in Alzheimer's disease.** *Nat Rev Neurosci* 2007, **8**:76–82.
14. Aguzzi A, Haass C: **Games played by rogue proteins in prion disorders and Alzheimer's disease.** *Science* 2003, **302**:814–818.
15. Cao X, Sudhof TC: **Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation.** *J Biol Chem* 2004, **279**:24601–24611.
16. Runz H, Rietdorf J, Tomic I, de Bernard M, Beyreuther K, Pepperkok R, et al: **Inhibition of intracellular cholesterol transport alters presenilin localization and amyloid precursor protein processing in neuronal cells.** *J Neurosci* 2002, **22**:1679–1689.
17. Sanchez-Varo R, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, et al: **Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer s mice hippocampus.** *Acta Neuropathol* 2012, **123**:53–70.
18. Yu WH, Kumar A, Peterhoff C, Shapiro Kulnane L, Uchiyama Y, Lamb BT, et al: **Autophagic vacuoles are enriched in amyloid precursor protein-secretase activities: implications for [beta]-amyloid peptide over-production and localization in Alzheimer's disease.** *Int J Biochem Cell Biol* 2004, **36**:2531–2540.
19. Yu WH, Cuervo AM, Kumar A, Peterhoff CM, Schmidt SD, Lee JH, et al: **Macroautophagy—a novel [beta]-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease.** *J Cell Biol* 2005, **171**:87–98.
20. Pasternak SH, Bagshaw RD, Guiral M, Zhang S, Ackerley CA, Pak BJ, et al: **Presenilin-1, Nicastrin, Amyloid Precursor Protein, and [gamma]-secretase activity Are Co-localized in the lysosomal membrane.** *J Biol Chem* 2003, **278**:26687.
21. Miners JS, Barua N, Kehoe PG, Gill S, Love S: **Abeta-degrading enzymes: potential for treatment of Alzheimer disease.** *J Neuropathol Exp Neurol* 2011, **70**:944–959.
22. Almeida CG, Takahashi RH, Gouras GK: **Beta-amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system.** *J Neurosci* 2006, **26**:4277–4288.
23. Han BH, Zhou M, Abousaleh F, Brendza RP, Dietrich HH, Koenigsnecht-Talboo J, et al: **Cerebrovascular dysfunction in amyloid precursor protein transgenic mice: contribution of soluble and insoluble amyloid-[beta] peptide, partial restoration via [gamma]-secretase inhibition.** *J Neurosci* 2008, **28**:13542–13550.
24. Oddo S, Caccamo A, Tseng B, Cheng D, Vasilevko V, Cribbs DH, et al: **Blocking A[beta]42 accumulation delays the onset and progression of tau pathology via the C terminus of heat shock protein70-interacting**


- protein: a mechanistic link between A β and Tau Pathology. *J Neurosci* 2008, **28**:12163–12175.
25. Wang X, Perry G, Smith MA, Zhu X: Amyloid beta derived diffusible ligands cause impaired axonal transport of mitochondria in neurons. *Neurodegener Dis* 2010, **7**:56–59.
26. Butler D, Hwang J, Estick C, Nishiyama A, Kumar SS, Baveghems C, et al: Protective effects of positive lysosomal modulation in Alzheimer's disease transgenic mouse models. *PLoS One* 2011, **6**:e20501.
27. Ramos B, Baglietto-Vargas D, Rio JC, Moreno-Gonzalez I, Santa-Maria C, Jimenez S, et al: Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1 x APP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2006, **27**:1658–1672.
28. Veeranna, Kaji T, Boland B, Odrjijn T, Mohan P, Basavarajappa BS, et al: Calpain mediates calcium-induced activation of the Erk1,2 MAPK Pathway and Cytoskeletal Phosphorylation in Neurons: relevance to Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 2004, **165**:795–805.
29. Shahpasand K, Uemura I, Saito T, Asano T, Hata K, Shibata K, et al: Regulation of mitochondrial transport and inter-microtubule spacing by Tau Phosphorylation at the sites hyperphosphorylated in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2012, **32**:2430–2441.
30. Bednarski E, Ribak CE, Lynch G: Suppression of Cathepsins B and L causes a proliferation of lysosomes and the formation of meganeurites in hippocampus. *J Neurosci* 1997, **17**:4006–4021.
31. Bi X, Zhou J, Lynch G: Lysosomal protease inhibitors induce meganeurites and tangle-like structures in entorhinohippocampal regions vulnerable to Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 1999, **158**:312–327.
32. Lee S, Sato Y, Nixon RA: Lysosomal proteolysis inhibition selectively disrupts axonal transport of Degradative organelles and causes an Alzheimer's-like axonal dystrophy. *J Neurosci* 2011, **31**:7817–7830.
33. Cai Q, Lu L, Tian JH, Zhu YB, Qiao H, Sheng ZH: Snapin-regulated late endosomal transport is critical for efficient autophagy-Lysosomal function in neurons. *Neuron* 2010, **68**:73–86.
34. Caballero C, Jimenez S, Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Gavilan M, et al: Inter-individual variability in the expression of the mutated form of hPS1M146L determined the production of Abeta peptides in the PS1xAPP transgenic mice. *J Neurosci Res* 2007, **85**:787–797.
35. Vetrivel KS, Cheng H, Kim SH, Chen Y, Barnes NY, Parent AT, et al: Spatial segregation of gamma-secretase and substrates in distinct membrane domains. *J Biol Chem* 2005, **280**:25892–25900.
36. Ffrench-McKee S, Koziel V, Kriem B, Potin FTY, Bihain BE, et al: Microtubule-associated Protein MAP1A, MAP1B, and MAP2 Proteolysis during Soluble Amyloid (beta)-Peptide-induced Neuronal Apoptosis: SYNERGISTIC INVOLVEMENT OF CALPAIN AND CASPASE-3. *J Biol Chem* 2006, **281**:229–240.
37. Higuchi M, Iwata N, Matsuba Y, Takano J, Suemoto T, Maeda J, et al: Mechanistic involvement of the calpain-calpastatin system in Alzheimer neuropathology. *FASEB J* 2012, **26**:1204–1217.
38. Liang B, Duan BY, Zhou XP, Gong JX, Luo ZG: Calpain activation promotes BACE1 expression, amyloid precursor protein processing, and amyloid plaque formation in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 2010, **285**:27737–27744.
39. Amadoro G, Corsetti V, Ciotti MT, Florenzano F, Capsoni S, Amato G, et al: Endogenous Abeta causes cell death via early tau hyperphosphorylation. *Neurobiol Aging* 2011, **32**:969–990.
40. Kilinc D, Gallo G, Barbee KA: Mechanical membrane injury induces axonal beading through localized activation of calpain. *Exp Neurol* 2009, **219**:553–561.
41. Noda-Saita K, Terai K, Iwai A, Tsukamoto M, Shitaka Y, Kawabata S, et al: Exclusive association and simultaneous appearance of congophilic plaques and AT8-positive dystrophic neurites in Tg2576 mice suggest a mechanism of senile plaque formation and progression of neuritic dystrophy in Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* 2004, **108**:435–442.
42. Tang Y, Scott DA, Das U, Edland SD, Radomski K, Koo EH, et al: Early and Selective Impairments in Axonal Transport Kinetics of Synaptic Cargoes Induced by Soluble Amyloid beta Protein Oligomers. *Traffic* 2012, **13**:681–693.
43. Zempel H, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM: Abeta oligomers cause localized Ca²⁺ elevation, missorting of endogenous tau into dendrites, Tau Phosphorylation, and destruction of microtubules and spines. *J Neurosci* 2010, **30**:11938–11950.
44. Zhang X, Garbett K, Veeraraghavalu K, Wilburn B, Gilmore R, Mirnics K, et al: A role for presenilins in autophagy revisited: normal acidification of lysosomes in cells lacking PSEN1 and PSEN2. *J Neurosci* 2012, **32**:8633–8648.
45. Mueller-Stener S, Zhou Y, Arai H, Roberson ED, Sun B, Chen J, et al: Anti-amyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications for Alzheimer's disease. *Neuron* 2006, **51**:703–714.
46. Asai M, Yagishita S, Iwata N, Saido TC, Ishiura S, Maruyama K: An alternative metabolic pathway of amyloid precursor protein C-terminal fragments via cathepsin B in a human neuroglioma model. *FASEB J* 2011, **25**:3720–3730.
47. Koh YH, von Arnim CAF, Hyman BT, Tanzi RE, Tesco G: BACE is degraded via the lysosomal pathway. *J Biol Chem* 2005, **280**:32499–32504.
48. Jin M, Shephardson N, Yang T, Chen G, Walsh D, Selkoe DJ: Soluble amyloid beta protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011, **108**:5819–5824.
49. Lee S, Sato Y, Nixon RA: Primary lysosomal dysfunction causes cargo-specific deficits of axonal transport leading to Alzheimer-like neuritic dystrophy. *Autophagy* 2011, **7**:1562–1563.
50. Vassar R, Kovacs DM, Yan R, Wong PC: The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. *J Neurosci* 2009, **29**:12787–12794.
51. Saura CA, Serviain-Morilla E, Scholl FG: Presenilin/gamma secretase regulates neurexin processing at synapses. *PLoS One* 2011, **6**:e19430.
52. Boland B, Smith DA, Mooney D, Jung SS, Walsh DM, Platt FM: Macroautophagy is not directly involved in the metabolism of amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 2010, **285**:37415–37426.
53. Cirrito JR, Kang JE, Lee J, Stewart FR, Verges DK, Silverio LM, et al: Endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of amyloid-beta in vivo. *Neuron* 2008, **58**:42–51.
54. Harris JA, Devidze N, Verret L, Ho K, Halabisky B, Thwin MT, et al: Transsynaptic progression of amyloid beta induced neuronal dysfunction within the entorhinal-hippocampal network. *Neuron* 2010, **68**:428–441.
55. Ronnback A, Sagelius H, Bergstedt KD, Naslund J, Westermarck GT, Winblad B, et al: Amyloid neuropathology in the single Arctic APP transgenic model affects interconnected brain regions. *Neurobiol Aging* 2012, **33**:831.
56. DeCalignon A, Polydoro M, Suarez-Calvet M, Williams C, Adamowicz D, Kopeikina K, et al: Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. *Neuron* 2012, **73**:685–697.
57. Liu L, Drouet V, Wu JW, Witter MP, Small SA, Clelland C, et al: Trans-synaptic spread of tau pathology in vivo. *PLoS One* 2012, **7**:e31302.
58. Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-estrada L, Sanchez-meijas E, et al: Extracellular amyloid- β and cytotoxic glial activation induce significant entorhinal neuron loss in young PS1 M146L APP 751SL mice. *J Alzheimers Dis* 2009, **18**:755–776.
59. Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, Planché M, et al: Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with A [beta] deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp Neurol* 2003, **184**:247–263.
60. Araujo F, Tan S, Ruano D, Schoemaker H, Benavides J, Vitorica J: Molecular and pharmacological characterization of native cortical gamma-aminobutyric acid(A) receptors containing both alpha(1) and alpha(3) subunits. *J Biol Chem* 1996, **271**:27902–27911.
61. Vitorica J, Pintado C, Gavilan E, Jimenez S, Rios RM, Vitorica J, et al: Dysfunction of the unfolded protein response increases neurodegeneration in aged rat hippocampus following proteasome inhibition. *Aging Cell* 2009, **8**:654–665.
62. Tamboli IY, Hampel H, Tien NT, Tolksdorf K, Breiden B, Mathews PM, et al: Sphingolipid storage affects autophagic metabolism of the amyloid precursor protein and promotes abeta generation. *J Neurosci* 2011, **31**:1837–1849.
63. Vitorica J, Satrustegui J: Involvement of mitochondria in the age-dependent decrease in calcium uptake of rat brain synaptosomes. *Brain Res* 1986, **378**:36–48.

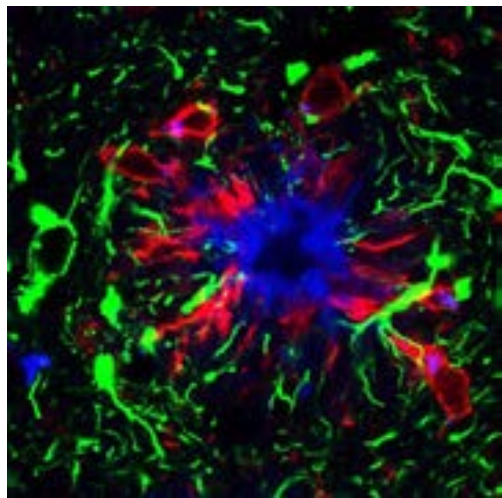
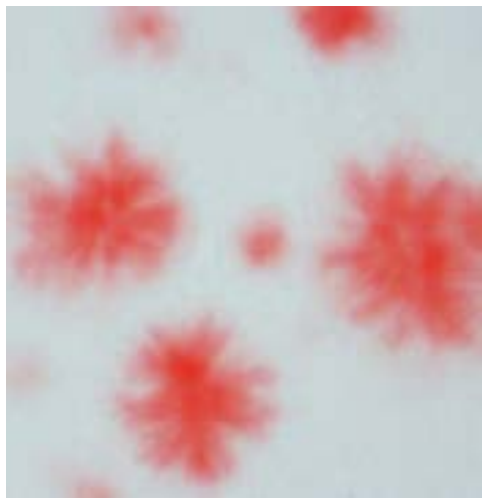
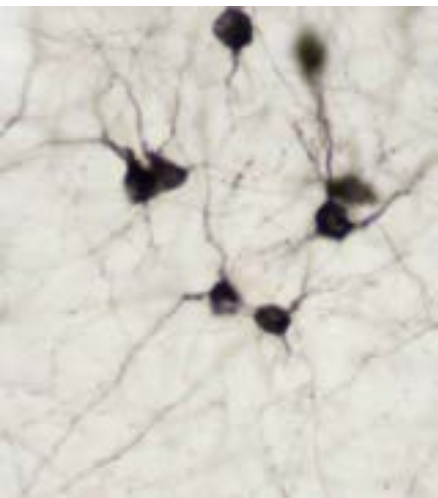
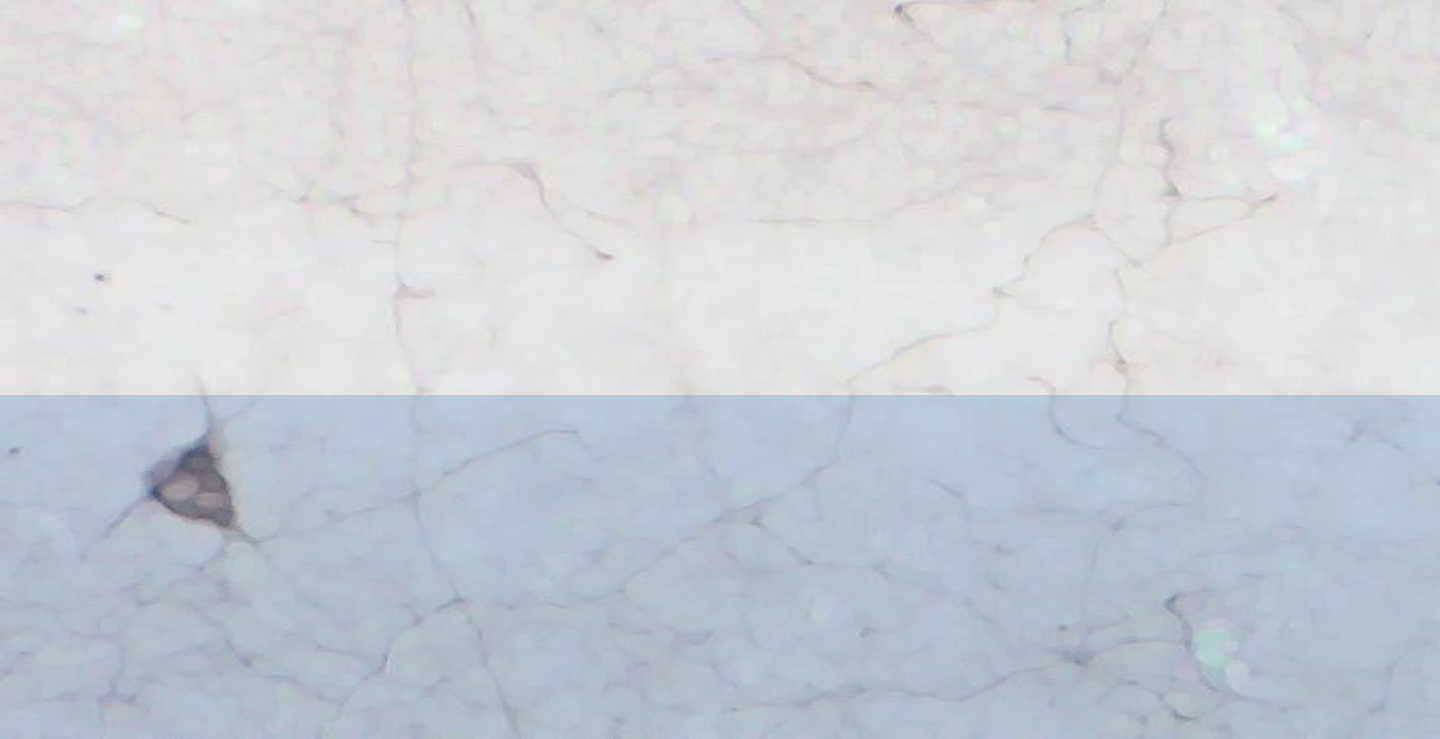
doi:10.1186/1750-1326-7-59

Cite this article as: Torres et al.: Defective lysosomal proteolysis and axonal transport are early pathogenic events that worsen with age leading to increased APP metabolism and synaptic Abeta in transgenic APP/PS1 hippocampus. *Molecular Neurodegeneration* 2012 **7**:59.

*Mucha gente pequeña, en lugares pequeños,
haciendo cosas pequeñas,
pueden cambiar el mundo.*

Eduardo Galeano





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA