



Dpto. Biología Celular, Genética y Fisiología
Área de Biología Celular, Facultad de Ciencias
Universidad de Málaga

Tesis Doctoral

ESTUDIO NEUROPATOLÓGICO DEL HIPOCAMPO Y GIRO PARAHIPOCAMPAL EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER: DE MODELOS TRANSGÉNICOS A HUMANOS

Elisabeth Sánchez Mejías

Directoras:


Dra. Antonia Gutiérrez Pérez

Dra. Inés Moreno González

Málaga 2015



AUTOR: Elisabeth Sánchez Mejías

 <http://orcid.org/0000-0001-6708-6708>

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



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología
Área de Biología Celular
Dra. Antonia Gutiérrez Pérez

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

Dra. Dña. Inés Moreno González, Assistant Professor at Department of Neurology of the University of Texas Health Science Center at Houston (EEUU),

INFORMAN

Que la Licenciada Dña. Elisabeth Sánchez Mejías ha realizado bajo su dirección el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral, titulada **“Estudio neuropatológico del hipocampo y giro parahipocampal en la enfermedad de Alzheimer: de modelos transgénicos a humanos”**.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firman el presente documento en Málaga, a 6 de julio de 2015.

Fdo.: Antonia Gutiérrez Pérez

Fdo.: Inés Moreno González



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 la Licenciada Dña. Elisabeth Sánchez Mejías ha realizado el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral, 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 6 de julio de 2015.

Fdo.: José Becerra Ratia

Proyectos

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. Elisabeth Sánchez Mejías, durante este tiempo ha disfrutado de una beca de Formación del Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación (convocatoria 2008), y un contrato de Investigación con cargo a Proyecto de Investigación.

Agradecimientos

Quizás la tarea más complicada sea escribir y transmitir sin datos cuantificables, ni medidas, ni desviaciones, ni porcentajes, todo mi agradecimiento a las personas que han hecho posible este trabajo. Porque no es solo mío, sino vuestro también.

Muchas gracias Antonia (jefa!) por todo lo que has hecho por mí desde el primer día que pisé tu despacho para pedirte consejo. Desde entonces me has apoyado y motivado, me has prevenido y a la vez cuidado, me has ayudado y me has guiado, como una jefa y también como una madre. Porque cada vez que me he venido abajo tú has sabido cómo impulsarme. Sin toda tu dedicación y confianza no hubiera podido llegar hasta aquí. Esta tesis es de las dos.

A mi codirectora, Inés, mi compañera de grupo y amiga también. Gracias por toda la dedicación que me ofreciste como parte del grupo y en los tres meses de estancia, me colmaste de ayuda diariamente y me guiaste en mis investigaciones.

A José Carlos, mi segundo jefe, gracias por tu cercanía, tu nobleza y tus ganas de ayudar. Que subieras por esas escaleras para formar parte del grupo ha sido una de las mejores cosas que nos podía pasar.

Como no hay dos sin tres, a mi tercer jefe, Javier. Muchas gracias por haber hecho posible este trabajo compartiendo parte de vuestro esfuerzo con nosotros, y porque las largas charlas sobre “¿qué le pasa a la microglía?” han supuesto un aliciente extra. Mis agradecimientos se extienden a todo el equipo de la Universidad de Sevilla que ha trabajado para completar y fortalecer los resultados de esta Tesis.

Al director del departamento de Biología Celular, el Dr. José Becerra, por permitirme realizar el trabajo de investigación en las instalaciones del departamento y por apoyar siempre a todos los que le solicitamos. Gracias por su completa disponibilidad.

Muchas gracias también a todos los compañeros del departamento de Biología Celular, profesores y becarios, por prestarme vuestra ayuda cuando la he requerido. ¡Gracias Ana! Por tu paciencia cada vez que nos metemos en líos de papeleo, siempre estás dispuesta a socorrernos. No me olvido de Pedro, al otro lado del pasillo, que nos acompaña en nuestros instantes de sosiego; ni de Kirill, que nos contenta con sus tartas y dulces rusos.

Llegó el momento más deseado, el que imaginaba a lo lejos casi a diario cuando entre risas y reflexiones nos reuníamos en corrillo todas las “niñas” y “niños” de la sala de becarios, en un intento de adivinar qué posición nos ganaríamos en los tan esperados agradecimientos. Y porque sois mi familia, os agradezco: a Laura, mi compañera a pie de guerra, mi amiga, gracias por estar siempre dispuesta a ayudarme, por tu paciencia infinita y por no haberte escuchado jamás una mala contestación; a Raquel, mi compañera, mi hermana, porque si hubiese tenido una hermana, habría querido que fuera como tú, no existen letras capaces de dar forma a todo lo que tengo que agradecerte; a Vanessa, mi compañera, mi princesa, la que me llena de abrazos y besitos cuando más lo necesito; a Rubén, mi compañero, nuestro protector oficial, porque aunque te llamemos “protestón”, tú siempre nos cuidas y nos mimas; a Juanjo, mi compañero, mi acompañante cuando me quedo sola en el hospital, y porque tu sonrisa es imborrable; a Mercedes, mi compañera, mi paño de lágrimas, la que te hace cambiar la decepción por la ilusión, muchas gracias por tantos instantes inolvidables; a Ángela, mi compañera, mi asesora y la más bonita, gracias por hacerme sentir que puedo contar siempre contigo, qué suerte haberte encontrado; a Cristina, mi

compañera y mi ayudante, la que me ofrece una mano incondicional en el laboratorio, ¡gracias!; a Alejandra, mi compañera, mi consejera, muchas gracias por preocuparte de mí y por demostrarme que una amiga no es la que dice sino la que hace. Jose, mi amigo, muchas gracias por transmitirme tu alegría y tu positividad, y por hacerme la vida más fácil, solo quiero rodearme de gente como tú, te echo mucho de menos. Trabajar con todos vosotros ha supuesto que la faena se convierta en descanso y que los días duros pasen de largo, ¡gracias familia!

Por supuesto a todos los que pasaron por esta sala, mis antiguos compañeros de grupo David, Juan Félix, Inés, gracias por enseñarme a investigar y por todo vuestro tiempo y paciencia en los torpes comienzos. A Diana, Mariló, Julia y Luis, gracias por adoptarme como una más, por vuestros consejos y por todas las carcajadas entre experimento y pasillo.

A todos mis amigos, muchas gracias por apoyarme, comprenderme y compartir conmigo momentos inolvidables. Especialmente, quiero agradecerle Silvia tu amistad incondicional, tus cuidados, tus ánimos constantes, sin los que no podría haber llegado hasta aquí.

Finalmente, mi más sincero agradecimiento, a toda mi familia. A mi tía, mi tío, mi madrina, mi ahijada, a Pili, Juan, Antonio, Trini, Laura, Daniel y Ana, por animarme a continuar estudiando y por estar siempre ahí cuando os he necesitado. Gracias mamá por tu continuo apoyo y ayuda, por tus buenos consejos, por transmitirme grandes valores, por confiar y creer en mí siempre y sobretodo, por no dejarme nunca tirar la toalla, solo quiero que estés orgullosa de mí. ¡Gracias mamá!

A mi familia

A mi madre

- A β** : β -amiloide
- AAC**: Angiopatia Amiloide Cerebral
- AD**: Enfermedad de Alzheimer, del inglés *Alzheimer's Disease*
- ADAM**: del inglés, *A Disintegrin And Metalloprotease*
- ADDLs**: Ligandos difusibles derivados del β -amiloide, del inglés, *Amyloid beta Derived Diffusible Ligands*
- ADEVA**: Análisis de la varianza
- AICD**: Dominio intracelular del APP, del inglés, *APP IntraCellular Domain*
- AMPA**: α -amino-3-hidroxi-5-metilisoazol-4-propionato
- ANOVA**: *Analysis of Variance*
- APLP**: del inglés *amyloid precursor-like proteína*
- ApoE**: Apolipoproteína E
- APP**: Proteína precursora β -amiloide
- BACE**: Enzima de corte del APP en el sitio β
- CA**: Asta de Ammón
- CaBP**: Proteína ligadora de calcio
- CB**: Calbindina
- CCK**: Colecistoquinina
- Cdk**: Proteín quinasa dependiente de ciclina
- CDR**: del inglés *clinical dementia rating*
- CE**: Corteza entorrinal
- ChaT**: Colín acetil transferasa
- CLU**: Clusterina
- CP**: Corteza Perirrinal
- CPH**: Corteza ParaHipocampal
- CR**: Calretinina
- CTF**: Fragmento C-terminal
- DAB**: 3-3'-diaminobencidina tetrahidroclorídrico
- DABCO**: 1,4-diazabicyclo [2.2.2.]-octano
- DEPC**: Dietil pirocarbonato
- DMEM-F12**:
- DN**: Densidad numérica
- DPX**: Dibutil ftalato
- EA**: Enfermedad de Alzheimer
- EAE**: encefalomiелitis autoinmune
- ECE**: Enzima convertidora de endotelina
- EDTA**: Ácido etilendiamino tetraacético
- FAD**: Enfermedad de Alzheimer Familiar, del inglés *Familial Alzheimer's Disease*
- FADD**: Dominio de muerte asociado a Fas
- FAIM_L**: Molécula inhibidora de la apoptosis mediada por Fas en su forma larga
- FASL**: Ligando de Fas
- fMRI**: Neuroimagen de resonancia magnética funcional
- FS**: del inglés, *fast spiking*
- GABA**: Ácido gamma amino butírico
- GAPDH**: del inglés *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
- GD**: Giro dentado
- GFAP**: Proteína glial fibrilar ácida, del inglés, *Glial Fibrillar Acidic Protein*
- GPH**: Giro ParaHipocampal.
- GSD**: del inglés, *Global Scale Deterioration*
- GSK3- β** : Quinasa glucógeno sintasa 3
- GWAS**: del inglés, *Genome Wide Association Studies*
- HIF1a**: Factor 1 inducible por hipoxia, del inglés, *Hypoxia Inducible Factor*
- HIPP**: del inglés, *Hilar Interneurons with axons innervating the terminal zone of the Perforant Pathway*
- HLA**: Antígeno leucocitario humano, del inglés *Human Leucocyte Antigen*
- HMG-CoA**: Hidroxi-Metil Glutaril CoEnzima A
- Iba1**: del inglés *Ionized calcium Binding Adapter molecule 1*
- IDE**: Enzima degradante de insulina, del inglés, *Insulin-Degrading Enzyme*
- IFN- γ** : Interferón gamma
- IGF-1**: Factor de crecimiento insulínico, del inglés, *Insuline Growth Factor*
- IL**: Interleuquina

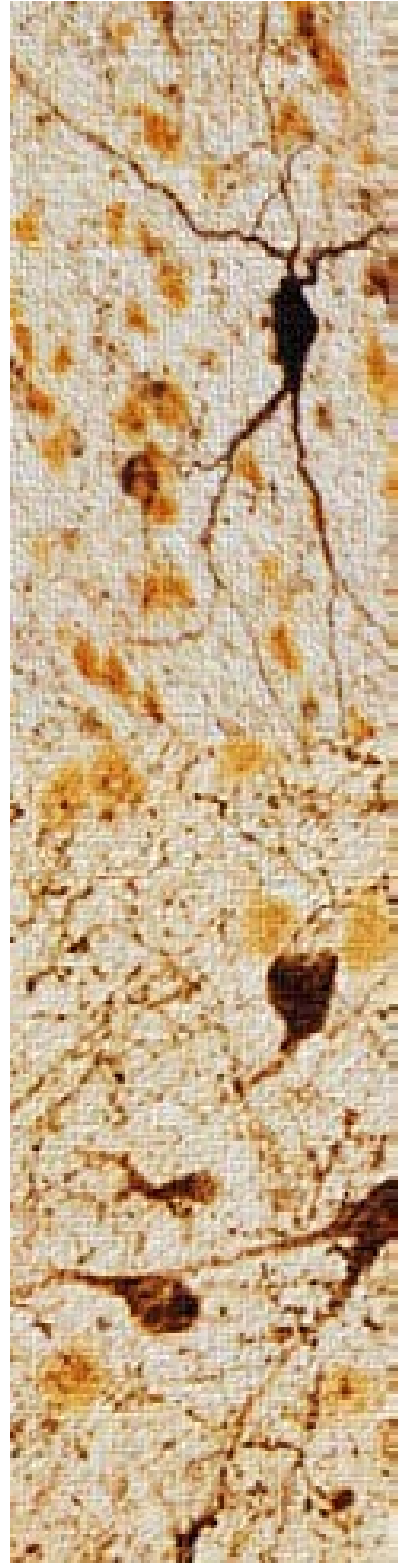
Abreviaturas

iNOS: Enzima sintasa de óxido nítrico inducible
KI: Knock-in
KO: Knock-out
LCR: Líquido cefalorraquídeo
LDL: Lipoproteína de baja densidad (del inglés *Low density Lipoprotein*)
LDLR: Receptor de lipoproteínas de baja densidad
LEnt: Corteza entorrinal lateral
LPS: Lipopolisacáridos
LTD: Depresión a largo plazo
LTP: Potenciación a largo plazo, del inglés, *Long Term Potentiation*
M1: Microglía clásica
M2: Microglía alternativa
MAP: Proteína asociada a microtúbulos
MCI: deterioro cognitivo leve, del inglés *Mild Cognitive Impairment*
MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad
MMSE: Mini examen del estado mental
MRC-1: Receptor de manosa, del inglés, *Mannose Receptor-1*
MRI: Neuroimagen de resonancia magnética, del inglés, *Magnetic Resonance Imaging*
MSR: del inglés *macrophage scavenger receptor*
NADPH: Nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato
NeuN: Núcleos neuronales
NF: Neurofilamento
NFTs: Ovillos neurofibrilares, del inglés, *Neurofibrillary tangles*
NMDA: Ácido N-metil-D-aspartico
NO: Óxido nítrico
NOS: Especies reactivas de nitrógeno
iNOS: Sintasa del óxido nítrico inducible
nNOS: Sintasa del óxido nítrico neuronal
NPY: Neuropeptido Y

NTs: Hebras neuropílicas, del inglés, *neuropil threads*
PaS: parasubículo
PB: Tampón fosfato
PBS: Tampón fosfato salino
PCR: Reacción de la polimerasa en cadena
PET: Tomografía de emisión de positrones
PHF: Filamentos apareados helicoidales
PI3K: Fosfoinositol 3 quinasa
PICALM: del inglés, *Phosphatidylinositol-binding Clathrin Assembly protein*
PLP: Paraformaldehído, L-lisina, Meta-peryodato sódico
PaS: parasubículo
PrS: presubículo
PrP: Proteína Priónica
PS1: Presenilina 1
PS2: Presenilina 2
PV: Parvalbúmina
RAGE: del inglés, *Receptor for Advanced Glycation Endproducts*
ROS: Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR: Reacción de la polimerasa en cadena a tiempo real
S: subículo
S1: fracción de proteínas soluble aislada bioquímicamente
sAPP α : Fracción APP alfa soluble
sAPP β : Fracción APP beta soluble
SD: desviación estándar
SIRP β 1: del inglés, *Signal Regulatory Protein β 1*
sl: stratum lucidum
slm: Stratum lacunosum-moleculare
SNAREs: del inglés, *Soluble NSF Attachment protein Receptors*
SNC: Sistema nervioso central
SNP: Sistema nervioso periférico
SOD: Superóxido dismutasa
SOM: Somatostatina

TBE: Tampón tris, ácido bórico, EDTA
Tc: Linfocito T citotóxico
TCR: Receptores de células T
Te_v: Corteza temporal ventral
TGF: Factor de crecimiento transformante
Th: Linfocito T helper
Th1: Linfocito T helper pro-inflamatorio
Th2: Linfocito T helper anti-inflamatorio
TioS: Tioflavina S
TLRs: del inglés, *Toll Like Receptor*
TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa
TNFR: Receptor del factor de necrosis tumoral
TPBS: Tampón fosfato salino
TRAIL: Ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF
TREM2: del inglés, *Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2*
UPR: Respuesta a proteínas mal plegadas (del inglés, *Unfolding Protein Response*)
VGAT: Transportador vesicular GABA
VGlut: Transportador vesicular de glutamato
VIP: Polipéptido intestinal vasoactivo
WB: western blot
WT: Genotipo salvaje, del inglés, *Wild Type*

Índice



1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	3
1.1.1. <i>Tipos de Alzheimer</i>	4
1.1.2. <i>Factores de riesgo</i>	4
1.1.3. <i>Neuropatología</i>	6
1.2. PROTEÍNA TAU HIPERFOSFORILADA	12
1.3. PÉPTIDO β-AMILOIDE	13
1.3.1. <i>La proteína precursora amiloide (APP)</i>	13
1.3.2. <i>Presenilina 1 y Presenilina 2</i>	14
1.3.3. <i>Generación, eliminación y agregación del β-amiloide</i>	15
1.3.4. <i>La hipótesis clásica de la cascada amiloide y nuevas posturas</i>	19
1.4. NEURODEGENERACIÓN: PATOLOGÍA NEURÍTICA, PÉRDIDA NEURONAL Y SINÁPTICA	20
1.4.1. <i>Patología neurítica</i>	20
1.4.2. <i>Pérdida neuronal y sináptica</i>	21
1.5. RESPUESTA NEUROINFLAMATORIA	22
1.5.1 <i>Microglía</i>	23
1.5.2. <i>Células mieloides del sistema inmune cerebral</i>	26
1.5.3. <i>Astroglía</i>	27
1.6. MODELOS TRANSGÉNICOS MURINOS DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	28
1.6.1. <i>Modelos monogénicos</i>	29
1.6.2. <i>Animales bigénicos y trigénicos</i>	29
1.7. FORMACIÓN HIPOCAMPAL	33
1.7.1. <i>Conexiones del hipocampo</i>	34
1.8. GIRO PARAHIPOCAMPAL	36
1.8.1. <i>Corteza perirrinal</i>	36

1.9. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO Y OBJETIVOS	39
2. MATERIALES Y MÉTODOS	43
2.1. SUJETOS DE ESTUDIO	45
2.1.1. <i>Muestras humanas post mortem</i>	45
2.1.2. <i>Animales de experimentación</i>	45
2.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS Y DELIMITACIÓN DE LAS ÁREAS CEREBRALES	48
2.2.1. <i>Procesamiento de los cerebros de ratón</i>	48
2.2.2. <i>Delimitación y situación de las regiones cerebrales de ratón</i>	49
2.2.3. <i>Procesamiento de las muestras humanas</i>	49
2.2.4. <i>Delimitación y situación de las regiones cerebrales de las muestras humanas</i>	51
2.3. TINCIONES HISTOLÓGICAS	51
2.3.1. <i>Violeta de cresilo</i>	51
2.3.2. <i>Tioflavina 6 6S</i>	53
2.4. TINCIONES INMUNOHISTOQUÍMICAS PARA MICROSCOPIA ÓPTICA	53
2.4.1. <i>Procedimiento general para microscopía óptica de campo claro</i>	53
2.4.2. <i>Procedimiento general para microscopía convencional de fluorescencia y microscopía láser confocal</i>	57
2.4.3. <i>Controles de la técnica inmunohistoquímica</i>	59
2.5. OBTENCIÓN DE IMÁGENES MICROSCÓPICAS	59
2.6. TÉCNICAS ESTEREOLÓGICAS DE RECUENTO CELULAR: DENSIDAD NUMÉRICA	60
2.7. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE IMAGEN PARA LA CARGA AMILOIDE Y LA CARGA GLIAL	62
2.8. ANÁLISIS DE LA COMPACTACIÓN DE LAS PLACAS DE Aβ	63
2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	64

2.10. APÉNDICE	64
MATERIALES Y MÉTODOS SUPLEMENTARIOS	
2.11. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS	67
2.11.1. Aislamiento de ARN y proteínas a partir de muestras de cerebro	67
2.11.2. Comprobación de la integridad del ARN purificado	69
2.11.3 Aislamiento de proteínas totales	69
2.11.4. Retrotranscripción	70
2.11.5. RT-PCR en tiempo real	71
2.11.6. Western-Blot	74
2.11.7. Aislamiento de proteínas solubles (S1)	76
2.12. ESTUDIOS IN VITRO	77
2.12.1. Cultivos de líneas celulares	77
2.12.2. Cultivos celulares primario	77
2.12.3. Tratamiento de Estimulación de cultivos celulares con fracción S1 de humanos	78
2.12.4. Determinación de la toxicidad de las fracciones solubles S1 de hipocampo humano y modelos APP/PS1 mediante citometría de flujo	79
2.12.5. Determinación de la toxicidad de las fracciones solubles S1 de hipocampo de ratón APP/PS1 sobre cultivos neuronales primarios	79
2.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	79
3. RESULTADOS	81
3.1. PROGRESIÓN DE LA PATOLOGÍA NEUROFIBRILAR EN EL HIPOCAMPO Y GIRO PARAHIPOCAMPAL DE MUESTRAS HUMANAS	87
3.2. PROGRESIÓN DE LA PATOLOGÍA AMILOIDE EN EL HIPOCAMPO Y GIRO PARAHIPOCAMPAL DE MUESTRAS HUMANAS	108
3.2.1. Patrón de distribución espacio temporal de la patología amiloide	108
3.2.2. Caracterización de las placas amiloides y la degeneración	119

<i>neurítica asociada</i>	
3.2.3. Angiopatía cerebral amiloide asociada a la enfermedad de Alzheimer	137
3.3. REACTIVIDAD GLIAL EN EL HIPOCAMPO Y GIRO PARAHIPOCAMPAL DE MUESTRAS HUMANAS Y PROGRESIÓN DE LA PATOLOGÍA DEL ALZHEIMER	141
3.3.1. Limitada activación microglial asociada a las placas de Aβ en los pacientes de Alzheimer	141
3.3.2. Estrecha interacción de la microglía activada con los depósitos de Aβ indicando un posible papel fagocítico y/o en la formación/compactación de las placas	149
3.3.3. Escasa infiltración de macrófagos y linfocitos en los pacientes de Alzheimer	156
3.3.4. Degeneración microglial en el hipocampo y giro dentado de los pacientes de Alzheimer (Braak V-VI)	166
3.3.5. Las fracciones solubles de hipocampo de pacientes de Alzheimer, y no de modelos APP/PS1, son tóxicas para la microglía in vitro	191
3.3.6. Reactividad astrogliar asociada al AB en el hipocampo giro parahipocampal de los pacientes de Alzheimer	192
3.4. NEURODEGENERACIÓN EN EL HIPOCAMPO Y GIRO PARAHIPOCAMPAL DE MUESTRAS HUMANAS Y DEL MODELO MURINO APP/PS1	207
3.4.1. Degeneración de interneuronas SOM y PV en el hipocampo y corteza perirrinal de los individuos dementes Braak V-VI	207
3.4.2. Diferente vulnerabilidad al proceso degenerativo de las poblaciones de interneuronas SOM y PV en la corteza perirrinal del modelo transgénico APP/PS1	214
3.5. EFECTO DE LA INHALACIÓN DEL HUMO DEL TABACO SOBRE LAS ALTERACIONES NEUROPATOLÓGICAS QUE PRESENTA EL MODELO TRANSGÉNICO DE ALZHEIMER APPSWE/PS1DE9	233
<i>Smoking Exacerbates Amyloid Pathology in a Mouse Model of Alzheimer's Disease</i>	234

4. DISCUSIÓN	253
<i>Limitaciones del estudio</i>	258
4.1. LA PATOLOGÍA ASOCIADA A FOSFO-TAU ES MÁS PROMINENTE QUE LA PATOLOGÍA Aβ EN EL HIPOCAMPO Y GIRO PARAHIPOCAMPAL HUMANO	259
4.1.1. <i>Las lesiones neurofibrilares asociadas a fosfo-tau progresan según el patrón espacio-temporal topográfico característico de los estadios de Braak</i>	
4.1.2. <i>Los pacientes de Alzheimer acumulan formas solubles de tau hiperfosforilado</i>	260
4.1.3. <i>La progresión de la patología amiloide muestra una gran variabilidad regional e interindividual en los pacientes, con afectación del hipocampo solo en las fases más avanzadas de la enfermedad</i>	262
4.1.4. <i>El hipocampo de los pacientes de Alzheimer desarrolla placas neuríticas</i>	263
4.1.5. <i>El giro hipocampal de los pacientes presenta una variedad de depósitos amiloides</i>	265
4.1.6. <i>Las placas amiloides podrían ser una fuente de Aβ oligomérico soluble</i>	266
4.1.7. <i>Los enfermos de Alzheimer desarrollan una extensa patología amiloide asociada a los vasos sanguíneos</i>	268
4.2. DISFUNCIÓN DE LA HOMEOSTASIS GLIAL EN LAS MUESTRAS HUMANAS CON PATOLOGÍA TIPO ALZHEIMER	269
4.2.1. <i>Existe una limitada activación microglial en los pacientes2 contraposición a la extensa reactividad microglial de los modelos transgénicos de amiloidosis</i>	270
4.2.2. <i>Posible papel de la microglía actividad en la dinámica de formación/compactación y/o eliminación de los depósitos fibrilares</i>	272
4.2.3. <i>Las células microgliales activadas no tienen un origen periférico</i>	274
4.2.4. <i>Existe un marcado proceso degenerativo de la microglía en pacientes, mientras que en modelos animales la microglía se activa y prolifera con el avance de la patología</i>	275
4.2.5. <i>Existe una marcada reactividad astrogliar asociada al Aβ en el hipocampo y giro hipocampal de los pacientes de Alzheimer</i>	282

4.3. EL PROCESO NEURODEGENERATIVO AFECTA SEVERAMENTE A LAS INTERNEURONAS SOM Y PV EN LOS PACIENTES, MIENTRAS QUE EN EL MODELO APP/PS1 MUESTRAN UNA VULNERABILIDAD DIFERENCIAL	285
4.3.1. Las interneuronas SOM se encuentran gravemente afectadas en los pacientes Braak V-VI así como en el modelo transgénico APP/PS1	285
4.3.2. Las interneuronas PV son muy sensibles al proceso degenerativo en pacientes, mientras que en los ratones APP/PS1 esta población GABAérgica es resistente al proceso de la patología	291
5. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	295
6. SUMMARY	301
7. BIBLIOGRAFÍA	325
8. ANEXO	349

1. INTRODUCCIÓN

Figura 1.1. Dibujo esquemático comparativo de un cerebro humano sano y otro de un paciente de Alzheimer	7
Figura 1.2. Estadios de Braak I-VI	8
Figura 1.3. Diferentes tipos de placas seniles que desarrollan los pacientes de Alzheimer	10
Figura 1.4. La acumulación de agregados de Abeta y fosfo-tau sigue un patrón topográfico determinado	11
Figura 1.5. Ovillos neurofibrilares intracelulares en una sección de cerebro de un paciente de Alzheimer Braak V-VI	12
Figura 1.6. Representación esquemática de la proteína APP	14
Figura 1.7. Esquema de las vías de procesamiento post-traduccionales del APP	16
Figura 1.8. Hipótesis de la cascada amiloide	19
Figura 1.9. Diferentes fenotipos de activación de la microglía	24
Figura 1.10. Células mieloides del Sistema Nervioso Central y sus marcadores específicos en estado quiescente y activado	26
Figura 1.11. Esquema de las conexiones del circuito trisináptico	35
Tabla 1.1. Modelos murinos transgénicos para el estudio de la enfermedad de Alzheimer	31

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 2.1. Esquema de las mutaciones que contiene la secuencia aminoacídica de la proteína APP751 humana en los ratones transgénicos APP/PS1	47
Figura 2.2. Delimitación de la corteza perirrinal y del hipocampo en los ratones empleados en el presente estudio	50
Figura 2.3. Delimitación y situación del lóbulo temporal medial que contiene la formación hipocámpal y la región parahipocámpal de las muestras humanas empleadas en este estudio	52
Figura 2.4. Representación de la técnica estereológica del disector óptico con la que se llevó a cabo el análisis de la densidad numérica de diferentes tipos celulares	61
Figura 2.5. Proceso de binarización con el programa de análisis de imagen Visilog 6.3.	62
Figura 2.6. Análisis en cuadrícula de la distribución diferencial de las células Iba1-positivas en el giro dentado	63
Figura 2.7. Cuantificación de la compactación de las placas	63

Tabla 2.1. Relación de los casos humanos analizados en el presente estudio, y los datos asociados de edad, sexo, tiempo <i>post mortem</i> , clasificación de Braak, síntomas clínicos de demencia y causa de la muerte	45
Tabla 2.2. Marcadores analizados en los estudios inmunohistoquímicos y sus características	54
Tabla 2.3. Relación de anticuerpos primarios empleados para los estudios inmunohistoquímicos de microscopía óptica	55
Tabla 2.4. Anticuerpos secundarios utilizados en los estudios inmunohistoquímicos de microscopía óptica de campo claro	57
Tabla 2.5. Relación de anticuerpos secundarios utilizados en los estudios inmunohistoquímicos de microscopía de fluorescencia	58
Tabla 2.6. Pasos para la purificación del ARN usando el sistema ABI <i>Prism 6100 Nucleic Acid PrepStation</i>	68
Tabla 2.7. Reactivos utilizados para la preparación de la mezcla de reacción 2X (Retromix)	70
Tabla 2.8. Relación de los reactivos empleados para la amplificación por PCR a tiempo real empleando SYBR-green I	71
Tabla 2.9. Relación de los reactivos empleados para la amplificación por PCR a tiempo real empleando sondas Taqman	72
Tabla 2.10. Programa predeterminado de amplificación para PCR a tiempo real	72
Tabla 2.11. Secuencia de cebadores empleados en la PCR	73
Tabla 2.12. Sondas Taqman para PCR	73
Tabla 2.13. Relación de reactivos y volúmenes necesarios para obtener geles de poliacrilamida-SDS (14% de acrilamida) en tampón Tricina	75
Tabla 2.14. Relación de reactivos y volúmenes necesarios para obtener geles de poliacrilamida-SDS (10% de acrilamida) en tampón Glicina	75
Tabla 2.15. Marcadores detectados mediante <i>Western-Blot</i>	76

3. RESULTADOS

Figura 3.1.1. Progresión de la patología neurofibrilar en las muestras humanas clasificadas según los estadios de Braak	89
Figura 3.1.2. Afectación de la patología neurofibrilar en el giro dentado de individuos en estadios tempranos de la enfermedad de Alzheimer	91
Figura 3.1.3. Afectación de la patología neurofibrilar en el giro dentado de individuos en estadios avanzados de la enfermedad de Alzheimer	93
Figura 3.1.4. Variabilidad en el grado de afectación de la patología de tau en individuos de un mismo estadio Braak	94
Figura 3.1.5. Cambios neurofibrilares en las regiones CA1/CA2 durante el curso de la enfermedad de Alzheimer	95
Figura 3.1.6. El subículo se encuentra gravemente afectado por la progresión de la patología neurofibrilar	97
Figura 3.1.7. Progresión de los cambios neurofibrilares en el giro	99

parahipocampal de muestras humanas en las etapas iniciales de la enfermedad	
Figura 3.1.8. Progresión de los cambios neurofibrilares en el giro parahipocampal de muestras humanas en estadios avanzados de la enfermedad	100
Figura 3.1.9. AT8 reconoce una mayor cantidad de fosfo-tau acumulado en el hipocampo de muestras humanas en comparación con AT100	103
Figura 3.1.10. AT8 reconoce una mayor cantidad de fosfo-tau acumulado en el giro parahipocampal de muestras humanas en comparación con AT100	104
Figura 3.1.11. Inmunohistoquímica para AT100 en el giro dentado, CA1 y giro parahipocampal de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Braak V-VI)	105
Figura 3.2.1. Patrón de distribución espacial de A β oligomérico, mediante inmunotinción con OC, en el hipocampo y giro parahipocampal de muestras humanas en estadio Braak II	112
Figura 3.2.2. Patrón de distribución espacial de A β oligomérico, mediante inmunotinción con OC, en el hipocampo y giro parahipocampal de muestras humanas en estadio Braak III-IV	113
Figura 3.2.3. Patrón de distribución espacial de A β oligomérico, mediante inmunotinción con OC, en el hipocampo y giro parahipocampal de pacientes Braak V-VI	114
Figura 3.2.4. El anticuerpo OC reconoce una mayor cantidad de depósitos de A β en comparación con el anticuerpo 4G8	115
Figura 3.2.5. Los animales transgénicos APP/PS1 presentan una mayor acumulación extracelular de A β con la edad, en comparación con los pacientes de Alzheimer	116
Figura 3.2.6. La afectación de la patología amiloide en el giro parahipocampal presenta una gran variabilidad entre individuos con el mismo estadio Braak	118
Figura 3.2.7. La acumulación extracelular de A β en el hipocampo sigue un patrón espacio-temporal a lo largo de los estadios de Braak	120
Figura 3.2.8. La acumulación extracelular de A β en el hipocampo humano presenta una distribución laminar, al igual que ocurre en el hipocampo de modelos APP/PS1	121
Figura 3.2.9. Estudio inmunohistoquímico de las placas seniles que se encuentran en la capa molecular del GD de pacientes de Alzheimer	122
Figura 3.2.10. Estudio inmunohistoquímico de las placas seniles que se encuentran en la capa polimórfica (hilio) del GD de pacientes de Alzheimer	125
Figura 3.2.11. Acumulación diferencial de A β en las regiones del hipocampo propio (CA) de pacientes dementes Braak V-VI	126
Figura 3.2.12. Estudio inmunohistoquímico de los diferentes tipos de	127

placas seniles que se encuentran en la región CA1 del hipocampo de individuos Braak V-VI	
Figura 3.2.13. Análisis comparativo de la acumulación de A β con el anticuerpo OC en las diferentes regiones del giro parahipocampal (presubículo, corteza entorrinal, y corteza perirrinal) de pacientes en estadios Braak II-III	128
Figura 3.2.14. Análisis comparativo de la acumulación de A β con el anticuerpo OC en las diferentes regiones del giro parahipocampal (presubículo, corteza entorrinal y corteza perirrinal) de pacientes con la enfermedad de Alzheimer	129
Figura 3.2.15. El giro parahipocampal de pacientes con Alzheimer (Braak V-VI) presenta una gran variabilidad en la proporción de placas neuríticas	130
Figura 3.2.16. Estudio inmunohistoquímico comparativo de los diferentes tipos de placas seniles que se encuentran en la corteza del giro parahipocampal de pacientes dementes Braak V-VI	132
Figura 3.2.17. Análisis comparativo de los tipos de depósitos amiloides que se encuentran en diferentes regiones del hipocampo y giro parahipocampal de un caso Braak V-VI con moderada patología neurítica	133
Figura 3.2.18. Análisis comparativo de los tipos de depósitos amiloides que se encuentran en diferentes regiones del hipocampo y giro parahipocampal de un caso Braak V-VI con abundante patología neurítica	134
Figura 3.2.19. A diferencia de lo que ocurre en el modelo transgénico APP/PS1, el grado de compactación de los depósitos de A β de los pacientes de Alzheimer no cambia con la progresión de la enfermedad	135
Figura 3.2.20. La corteza perirrinal de los pacientes dementes Braak V-VI presenta una mayor deposición amiloide extracelular	136
Figura 3.2.21. Estudio comparativo de los diferentes tipos de placas seniles entre ratones transgénicos APP/PS1 y pacientes Braak V-VI mediante doble marcaje fluorescente para OC y A β fibrilar (TioS) e inmunotinción para A β 42	138
Figura 3.2.22. El hipocampo y giro parahipocampal de la mayoría de las muestras humanas Braak IV-VI desarrollan una severa angiopatía cerebral amiloide	139
Figura 3.2.23. Placas neuríticas clásicas asociadas a los vasos sanguíneos	140
Figura 3.3.1. Patrón de distribución de las células microgliales en el GD, CA1 y GPH a lo largo de los estadios de Braak	143
Figura 3.3.2. Estudio morfológico de los diferentes fenotipos microgliales (estado quiescente y estado activado), hallados en las muestras humanas analizadas	145
Figura 3.3.3. Las agrupaciones de células microgliales activadas asociadas a las placas son positivas para el marcador CD68	147
Figura 3.3.4. Las agrupaciones de células microgliales activadas asociadas a	148

las placas de la región hipocampal CA1 son positivas para el marcador CD68	
Figura 3.3.5. Iba1 y CD68 se sobreexpresan en la microglía reactiva	151
Figura 3.3.6. Las células microgliales reactivas que se encuentran asociadas a las placas presentan A β en su interior, indicando una posible actividad fagocítica	153
Figura 3.3.7. La interacción de la microglía reactiva con los depósitos de A β sugiere un posible papel de estas células en la formación/compactación de las placas amiloides	154
Figura 3.3.8. Relación de la microglía reactiva con las placas amiloides	155
Figura 3.3.9. Asociación microglía/placa en muestras humanas en estadio Braak IV-VI y en el modelo APP/PS1	157
Figura 3.3.10. Relación microglía/placa en el hipocampo y giro parahipocampal de un paciente de Alzheimer Braak V-VI	159
Figura 3.3.11. En el modelo transgénico APP/PS1 el marcador CD45 se expresa en la microglía activada que rodea las placas de A β y en linfocitos T (CD3-positivos) infiltrados	161
Figura 3.3.12. Moderada inmunorreactividad para CD45 en el GD y CA1 del hipocampo de pacientes dementes Braak V-VI	162
Figura 3.3.13. En el hipocampo y giro parahipocampal de los pacientes de Alzheimer se produce una escasa infiltración de macrófagos y linfocitos	163
Figura 3.3.14. El giro dentado del modelo transgénico APP/PS1 presenta un aumento de la reactividad microglial con la edad, en contraposición a lo observado en pacientes de Alzheimer	168
Figura 3.3.15. Disminución de la población de células microgliales Iba1-positivas en el giro dentado de los pacientes de Alzheimer Braak V-VI en comparación con los individuos en estadio Braak II	170
Figura 3.3.16. Degeneración microglial en el giro dentado de pacientes Braak V-VI	171
Figura 3.3.17. Estudio comparativo de la población de células microgliales en las regiones CA3, CA1 y GPH de individuos Braak II y pacientes dementes Braak V-VI	172
Figura 3.3.18. El giro dentado y CA3 son las regiones más afectadas por la degeneración microglial en los individuos Braak V-VI	173
Figura 3.3.19. El giro dentado de los pacientes de Alzheimer (Braak V-VI) presenta áreas despobladas de microglía, incluso en las zonas más próximas a las placas de A β	176
Figura 3.3.20. Al igual que ocurre en el giro dentado, en algunas regiones del hipocampo propio y del giro parahipocampal de pacientes Braak V-VI se encuentran áreas despobladas de microglía, incluso en las zonas más próximas al A β	177
Figura 3.3.21. Efecto del A β sobre la población microglial en el Presubículo de un individuo Braak V-VI	178
Figura 3.3.22. P2ry12 es un marcador de la población de microglía no reactiva	179

Figura 3.3.23. Las células microgliales activadas asociadas a los depósitos amiloides son negativas para el marcador P2ry12	180
Figura 3.3.24. La población microglial P2ry12-positiva se encuentra afectada en el hipocampo y giro parahipocampal de los pacientes dementes Braak V-VI	183
Figura 3.3.25. Reducida reactividad microglial en los pacientes de Alzheimer	186
Figura 3.3.26. La microglía del giro dentado de la mayoría de los pacientes de Alzheimer presenta características morfológicas degenerativas	187
Figura 3.3.27. La expresión de ferritina se incrementa en la región CA1 a lo largo de los estadios de Braak	188
Figura 3.3.28. La microglía asociada a los depósitos amiloides expresa una gran cantidad de ferritina en las muestras <i>post mortem</i> de pacientes de Alzheimer y modelos APP/PS1	190
Figura 3.3.29. Escasa proliferación celular en el hipocampo y giro parahipocampal de los enfermos de Alzheimer	193
Figura 3.3.30. El hipocampo y el giro parahipocampal de los pacientes de Alzheimer presentan un aumento de la reactividad astrocitaria en comparación con los individuos de estadios leves	197
Figura 3.3.31. Patrón de distribución de la astroglia GFAP-positiva en el GD, CA1 y GPH de casos dementes Braak V-VI y casos leves Braak II	198
Figura 3.3.32. El hipocampo de los pacientes de Alzheimer desarrolla una respuesta astrogliar inflamatoria	199
Figura 3.3.33. Estudio comparativo entre el clásico marcador de astroglia GFAP y el marcador constitutivo ALDH1L1	200
Figura 3.3.34. Relación de la astroglia reactiva con las placas amiloides	202
Figura 3.3.35. Los astrocitos del hipocampo y giro parahipocampal de los enfermos de Alzheimer producen TNF α	203
Figura 3.3.36. El hipocampo del modelo transgénico APP/PS1 desarrolla una extensa respuesta astrocitaria a lo largo del envejecimiento, al igual que ocurre en los enfermos de Alzheimer	204
Figura 3.3.37. Interacción glía/placa de A β en el hipocampo del modelo transgénico APP/PS1 y en los pacientes de Alzheimer	205
Figura 3.4.1. Reducción significativa de interneuronas SOM-positivas en el hipocampo de individuos dementes	209
Figura 3.4.2. Disminución de la población de interneuronas SOM-positivas en la región CA1 del hipocampo de individuos dementes Braak V-VI	211
Figura 3.4.3. Disminución significativa de interneuronas SOM-positivas en la corteza peririnal de individuos dementes	212
Figura 3.4.4. Inmunohistoquímica para PV en el giro dentado de individuos en estadio Braak II y Braak V-VI	215
Figura 3.4.5. Reducción significativa de la población de interneuronas PV-	216

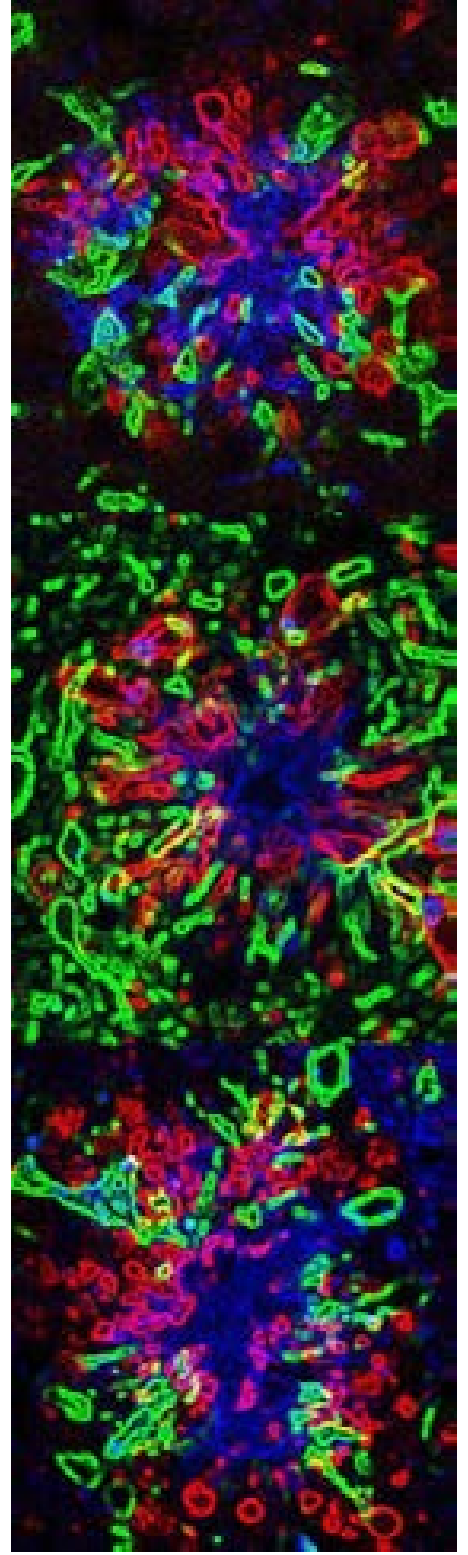
positivas en el hipocampo de individuos dementes	
Figura 3.4.6. Reducción significativa de la población de interneuronas PV-positiva en la corteza perirrinal del giro parahipocampal de individuos dementes	217
Figura 3.4.7. Limitada patología tau en las interneuronas SOM-positivas	219
Figura 3.4.8. Ausencia de patología tau en la población de interneuronas PV-positivas	220
Figura 3.4.9. Delimitación anatómica de la corteza perirrinal en el cerebro del ratón WT y transgénico APP/PS1	223
Figura 3.4.10. Degeneración de la población de interneuronas SOM-positivas en la corteza perirrinal de los transgénicos APP/PS1 desde edades tempranas	224
Figura 3.4.11. Reducción significativa de interneuronas SOM-positivas en las capas profundas de la corteza entorrinal de ratones transgénicos APP/PS1 desde los 6 meses de edad	225
Figura 3.4.12. La subpoblación de neuronas SOM-positivas que expresan nNOS no se encuentra afectada en la corteza perirrinal del modelo APP/PS1	228
Figura 3.4.13. Progresión con la edad de la patología amiloide extracelular en la corteza perirrinal de los animales transgénicos APP/PS1	229
Figura 3.4.14. La población de interneuronas PV-positivas es resistente al proceso degenerativo en la corteza perirrinal del modelo transgénico APP/PS1	231
Figura suplementaria 3.1. Acumulación de monómeros y oligómeros de fosfo-tau en el hipocampo de individuos dementes Braak V-VI	106
Figura suplementaria 3.2. Aumento significativo de las formas monoméricas fosforiladas de tau en la fracción soluble del hipocampo de individuos dementes Braak V-VI	107
Figura suplementaria 3.3. <i>Western Blot</i> de hipocampo de individuos Braak V-VI y de ratones APP/PS1 incubadas con el anticuerpo 6E10	111
Figura suplementaria 3.4. Análisis cuantitativo de la expresión de ARNm de marcadores generales de microglía (CD11b e Iba1) y marcadores específicos de activación (CD45 y CD68)	152
Figura suplementaria 3.5. La microglía activada expresa un perfil de marcadores similar al de macrófagos periféricos	164
Figura suplementaria 3.6. La expresión de marcadores de microglía no reactiva se reduce significativamente en el hipocampo y giro parahipocampal de los pacientes de Alzheimer	185
Figura suplementaria 3.7. La fracción S1 del hipocampo de individuos Braak V-VI produce un efecto tóxico específico sobre la microglía	194
Figura suplementaria 3.8. Expresión de ARNm de los marcadores neuronales SOM, NPY y PV en el hipocampo de muestras humanas control	218

y Braak II, III-IV y V-VI

Figura suplementaria 3.9. Las interneuronas parvalbúmina son resistentes *in vitro* a la presencia de A β soluble procedente de cerebro de modelos APP/PS1 232

Tabla 3.2.1. Relación de los casos humanos analizados en el presente estudio, para la caracterización de la patología amiloide y los y los datos referentes a la edad, sexo, tiempo *post mortem*, clasificación de Braak, síntomas clínicos de demencia y neuropatología amiloide de las muestras 109

1. Introducción



1.1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (AD) es una proteinopatía neurodegenerativa progresiva e irreversible caracterizada por la acumulación de depósitos extracelulares de péptidos β -amiloide (A β) y la aparición de ovillos intracelulares neurofibrilares, formados por la proteína tau hiperfosforilada, junto con un proceso neuroinflamatorio así como pérdida de sinapsis y muerte neuronal selectiva en regiones cerebrales superiores responsables de los procesos de memoria y aprendizaje (revisado en Castellani et al. 2010; Perl 2010; Reitz et al. 2011; Serrano-Pozo et al. 2011; Karch et al. 2014). Desde el punto de vista clínico, la enfermedad empieza con una fase "preclínica" asintomática, seguida de una fase "prodrómica" (llamada generalmente de deterioro cognitivo leve o MCI, del *inglés mild cognitive impairment*) y por último una fase de "demencia". La ausencia actual de terapias efectivas que modifiquen el curso natural de la AD, y el rápido crecimiento de su prevalencia, plantea la necesidad urgente de profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares y celulares de dicha enfermedad.

La pérdida de memoria (manifestada como la dificultad de recordar hechos recientemente aprendidos y de adquirir nueva información) es el primer, y más característico, síntoma de esta enfermedad. Otros síntomas que también aparecen durante su evolución son apraxia (incapacidad de realizar movimientos o gestos aprendidos a pesar de tener la capacidad física), afasia (alteración del lenguaje), agnosia (incapacidad de reconocimiento de personas u objetos), desorientación espacio-temporal y disminución del razonamiento. El declive cognitivo, así como el empeoramiento en la sintomatología en general, progresa gradualmente a lo largo de las fases leve, moderada y grave de la enfermedad. Finalmente, en la fase terminal los afectados acaban en un estado vegetativo y la muerte suele producirse por causas secundarias, siendo la neumonía la más común (Castellani et al. 2010; McKhann et al. 2011; Webster et al. 2014).

La AD es el tipo de demencia de mayor incidencia y la más común entre las personas mayores de 65 años con una estimación de 44 millones de afectados a nivel mundial. Se estima, teniendo en cuenta el envejecimiento progresivo de la población, que este número se duplique para 2030 y triplique para 2050 (World Alzheimer Report 2014; <http://www.alz.co.uk/research/world-report-2014>). Se calcula además, que en España padecen esta enfermedad actualmente entre 500.000 y 800.000 personas (Lilly S.A., 2012).

Desde que Alois Alzheimer, neuropatólogo y psiquiatra alemán, describiera por primera vez en 1906 las características clínicas y patológicas de esta enfermedad (Alzheimer 1907), han sido muchos los hallazgos científicos que han permitido conocer parte de los mecanismos celulares que desencadenan esta patología. Sin embargo, actualmente todavía se desconoce la causa o causas exactas que la originan, no existe un test *pre mortem* para un diagnóstico concluyente, y tampoco existe ningún tratamiento farmacológico efectivo que modifique el curso de la enfermedad (los que actualmente están aprobados son solo de carácter sintomático).

1.1.1 Tipos de Alzheimer

La AD se puede dividir en dos tipos según la edad de inicio, su incidencia y su principal causa de aparición. No obstante, ambas formas de Alzheimer cursan con los mismos síntomas y lesiones histopatológicas:

- **Alzheimer Familiar (de inicio temprano) o FAD** (del inglés *Familial Alzheimer's Disease*): Se caracteriza por su aparición a edades tempranas (entre los 35 y 40 años de edad) (Ringman et al. 2015). Este tipo de Alzheimer se transmite genéticamente con carácter autosómico dominante y representa el 1% de todos los casos de Alzheimer. Actualmente, sólo se conocen tres genes que estén directamente implicados en el desarrollo de esta enfermedad (ver revisiones O'Brien y Wong 2011; Karch et al. 2014; Calero et al. 2015): el gen de la presenilina 1 (PS1), localizado en el cromosoma 14, cuya mutación es la causa más común de las formas familiares de la AD (Sherrington et al. 1995), conociéndose 185 mutaciones distintas, entre ellas la F176L que portaba Auguste Deter (Müller et al. 2013); el gen de la presenilina 2 (PS2), con una alta homología con la PS1, localizado en el cromosoma 1 (Rogaev et al. 1995) y del que se han descrito alrededor de 14 mutaciones asociadas con el Alzheimer; y el gen de la proteína precursora β -amiloide (APP), que se encuentra en el cromosoma 21 (Goate et al. 1991) y para el que se han descrito 32 mutaciones relacionadas con la EA (para detalle ver www.molgen.ua.ac.be/ADmutations/).

- **Alzheimer esporádico (de inicio tardío)**: Esta forma de Alzheimer la padecen el 95-98% de los afectados y su incidencia es baja hasta los 60-65 años de edad, afectando a menos del 5% de la población. Sin embargo, a partir de esta edad, el porcentaje de incidencia se duplica cada 5 años, lo que supone que una de cada tres personas por encima de los 85 años la padecen (Jahn 2013). Las causas que conllevan a la aparición de Alzheimer esporádico no se conocen, y se le otorga un origen multifactorial, aunque el principal factor de riesgo es el envejecimiento.

1.1.2. Factores de riesgo

- **Edad**: Es el factor de mayor importancia para desarrollar el Alzheimer esporádico, ya que la prevalencia de la EA aumenta con la edad y se duplica cada 5 años entre los 65 y 85 años de edad (Katzman 1976). Se desconoce de qué manera está asociada con este factor, aunque se cree que puede tener relación con el daño producido por los radicales libres del metabolismo celular, que generan estrés oxidativo en los lípidos y proteínas de membrana, contribuyendo a la muerte celular (Castellani et al. 2010)

- **Genes**: Hasta el momento se han identificado tres genes relacionados con la enfermedad de Alzheimer, que están directamente involucrados en la aparición de la forma familiar (PS1, PS2 y APP).

Además, la AD se asocia con determinados polimorfismos genéticos (revisado en Beltran et al. 2010; Ballard et al. 2011; Karch et al. 2014; Calero et al. 2015)

Apolipoproteína E (ApoE): localizada en el cromosoma 19. Es una proteína polimórfica, con 3 alelos ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$), siendo $\epsilon 4$ el que más eleva el riesgo de padecer la forma esporádica de AD. De hecho, la isoforma E4 de la APOE está considerada el mayor factor de riesgo de la AD esporádica tras la edad, incrementando su riesgo tres veces en individuos que portan una copia de este alelo y en 15 veces en individuos homocigotos. Por otro lado, el alelo $\epsilon 2$, parece tener un papel protector (Corder et al. 1994). Una de sus funciones básicas es servir de ligando a receptores de LDL (*low density lipoprotein*), que median la asimilación de colesterol por parte de las neuronas. Su implicación en la AD se relaciona con su capacidad de interactuar con las placas de $A\beta$, desencadenándose una cadena de eventos que favorecen su formación o dificultan su eliminación (Kim et al. 2014).

CLU: codifica para una región de la cadena- β de la clusterina, y se localiza en el cromosoma 8. En ciertas regiones cerebrales de pacientes de AD, su expresión se ve aumentada (Calero et al. 2000; Björkhem et al. 2010). Su actividad chaperona prevendría la oligomerización/fibrilización del $A\beta$, formando complejos que atravesarían la barrera hematoencefálica. Las mutaciones en el gen propiciarían la formación de las placas (Bagyinszky et al. 2014).

PICALM (*phosphatidyl inositol-binding clathrin assembly protein*): ubicado en el cromosoma 11. Codifica para un adaptador de clatras que regula la formación de la envoltura de coatómeros en la membrana plasmática. Regula la endocitosis de algunas SNAREs (Moreau et al. 2014) por lo que se piensa que podría influir en el procesamiento de APP a través de la ruta endocítica y de eliminación del $A\beta$ (Harold et al. 2009). También afecta a los procesos de autofagia a través de proteínas de adhesión a microtúbulos como tau (Moreau et al. 2014)

TREM2 (*Triggering receptor expressed on myeloid cells 2*): Distintas variantes de este gen confieren un alto riesgo de desarrollar la AD. Este gen codifica para un importante modulador de la función inmune celular. En el cerebro, los receptores de esta proteína se expresan exclusivamente en células mieloides, en concreto en macrófagos derivados de monocitos circulantes. En la enfermedad de Alzheimer, TREM2 aumenta su expresión de manera dependiente de la edad. Además, la deficiencia en TREM2 reduce algunas alteraciones histopatológicas de la EA (neuroinflamación, deposición de $A\beta$ en el hipocampo e hiperfosforilación de la proteína tau) (Jay et al. 2015).

La lista de genes implicados en la AD es aún mayor (ver revisión Calero et al. 2015): *$\alpha 2$ -macroglobulina* (Flachsbart et al. 2010), *fosfolipasa A2* (Cordeiro et al. 2010), *sortilina-1* (Rogaeva et al. 2007), *ADAM10* (Kim et al. 2009), *fosfolipasa D3 (PLD3)* (Cruchaga et al. 2014), etc., aunque no entraremos a analizarlos todos en el presente trabajo.

Por último, hay otros factores no genéticos que también modifican la incidencia de padecer AD como:

- **Género:** La mujer tiene un riesgo mayor que el hombre de padecer la enfermedad de Alzheimer (Reiman y Caselli 1999; Ampuero et al. 2008) aunque el motivo de ello es desconocido. Han sido propuestos factores hormonales, ya que los estrógenos poseen un papel neuroprotector, por lo que su pérdida con la edad en la mujer podría incrementar las posibilidades de desarrollar la enfermedad (Maccioni et al. 2001). Además, se ha visto que los estrógenos disminuyen la producción de β -amiloide ($A\beta$) en cultivos celulares (Turner 2001). También las gonadotropinas, principalmente la hormona luteinizante, podrían estar relacionadas con la mayor susceptibilidad de las mujeres a padecer la AD (Webber et al. 2007).
- **Enfermedades cardiovasculares:** Actualmente se sabe que la hipertensión, la aterosclerosis, el infarto o la isquemia cerebral incrementan la probabilidad de desarrollar la AD, además de poder desencadenar demencia vascular, la segunda causa de demencia tras el Alzheimer (van Norden et al. 2012). También se ha descrito que las enfermedades cardíacas y los infartos incrementan el deterioro de los pacientes de Alzheimer y pueden contribuir al inicio de la enfermedad (Regan et al. 2006; de la Torre 2006). Además, la AD suele aparecer asociada a una extensa angiopatía amiloide cerebral o AAC (depósitos de $A\beta$ en los vasos sanguíneos cerebrales).
- **Otras enfermedades:** No sólo las enfermedades cardiovasculares son factores de riesgo para la AD, sino también otras, como son la diabetes mellitus tipo II (De Felice y Ferreira 2014), el síndrome de Down (presenta trisomía del cromosoma 21 en el que se encuentra el gen que codifica para el APP) así como otras dolencias asociadas a procesos inflamatorios.
- **Exposición a metales:** El aluminio es una sustancia neurotóxica que se asocia con la aparición de AD, posiblemente debido a una exposición a aluminio monomérico orgánico en el agua de beber (Gauthier et al. 2000; Di Paolo et al. 2014). Altos niveles de hierro, cobre, zinc, mercurio y plomo también representan factores de riesgo.
- **Otros factores,** como la dieta (Blennow et al. 2006; Otaegui-Arrazola et al. 2014); el nivel educacional (reserva cognitiva) (Reiman y Caselli 1999; Blennow et al. 2006), o el nivel de actividad física (Scarmeas et al. 2009) también se han relacionado con la incidencia de AD.

1.1.3. Neuropatología

- Cambios a nivel macroscópico

El cerebro de los pacientes de Alzheimer sufre atrofia cortical, adelgazamiento de las circunvoluciones, ensanchamiento de los surcos, engrosamiento de las meninges, dilatación de los

ventrículos y disminución del peso y volumen cerebral. La atrofia afecta principalmente al giro parahipocampal del lóbulo temporal, aunque también afecta al lóbulo frontal y parietal (Fig. 1.1). Este patrón de cambios puede reconocerse mediante imágenes de resonancia magnética (MRI) de los pacientes de Alzheimer, y se comprueba que, efectivamente, la atrofia cortical e hipocampal se correlaciona con los resultados *post mortem* asociados a la enfermedad (Castellani et al. 2010; Perl 2010). En la figura 1.1 puede observarse que las alteraciones macroscópicas que ocurren en un cerebro afectado por la AD en comparación con un cerebro sano.

Por lo general, estos cambios vienen acompañados de una patología cerebrovascular, por lo que también son característicos los micro infartos, infartos lacunosos en los ganglios basales así como desmielinización de la sustancia blanca periventricular (Serrano-Pozo et al. 2011).

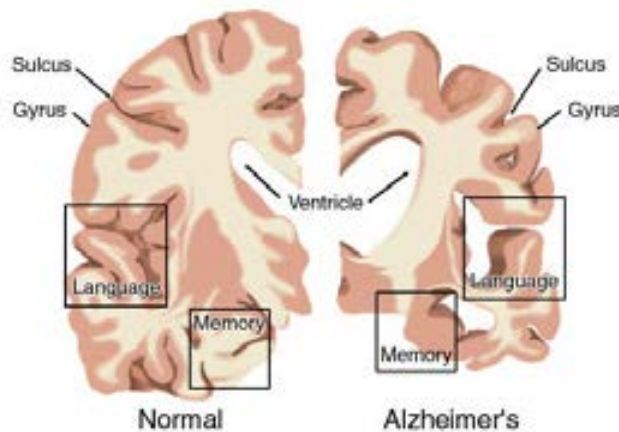


Figura 1.1. Dibujo esquemático comparativo de un cerebro humano sano (hemisferio izquierdo) y otro de un paciente de Alzheimer (hemisferio derecho). El cerebro afectado por AD posee menor volumen y presenta dilatación ventricular. La atrofia afecta a los lóbulos temporales, frontales, parietales y occipitales. Las regiones donde residen las funciones de memoria (hipocampo) y lenguaje (áreas de Broca y de Wernicke) son las más afectadas.

- Cambios a nivel microscópico

Las principales marcas histopatológicas de la enfermedad de Alzheimer son las lesiones neurofibrilares que se forman en el interior de las neuronas y la acumulación extracelular de depósitos amiloides. Además, se produce una extensa pérdida neuronal y sináptica, junto con un proceso inflamatorio caracterizado por activación microglial y astrogliosis. Por último, se observa la presencia de cuerpos de Hirano, que son inclusiones citoplasmáticas caracterizadas por la presencia de filamentos de actina y otras proteínas asociadas, como la proteína tau (Hirano 1994).

Ovillos neurofibrilares

Los ovillos neurofibrilares o NFTs (del inglés *neurofibrillary tangles*) es una de las principales marcas histopatológicas que caracterizan la AD y fueron descritos por primera vez por Alois Alzheimer como inclusiones intraneuronales filamentosas en el citoplasma de las neuronas piramidales. Los NFTs están formados por agregados fibrilares de la proteína tau hiperfosforilada. Pueden encontrarse en tres estadios morfológicos: pre-NFTs o NFTs difusos (*pre tangles*), en los que la neurona todavía conserva su apariencia sana; NFTs intracelulares, en los que las fibras desplazan al núcleo y aparecen tortuosidades en la dendrita apical y en el segmento proximal del axón; y NFTs extracelulares (*ghost tangles*), en los que las fibras se localizan en el exterior celular tras la muerte

neuronal (revisado en Serrano-Pozo et al. 2011). Además, los agregados de tau hiperfosforilado pueden acumularse no solo en el soma neuronal sino también en los procesos neuríticos, en forma de filamentos (hebras) de neuropilo o NTs (del inglés *neuropil threads*) y neuritas distróficas. Los NTs (Braak et al. 1986) aparecen siempre asociadas a NFTs, y se interpretan como segmentos de dendritas y axones de las neuronas que contienen ovillos. Contribuyen considerablemente a la carga total de patología neurofibrilar.

La distribución topográfica de las lesiones neurofibrilares presenta un patrón de progresión determinado a lo largo de la enfermedad, pudiéndose distinguir seis estadios o etapas, llamados estadios de Braak (Braak y Braak 1991; Braak et al. 2006)(ver figura 1.2). Los primeros NFTs se desarrollan en la corteza perirrinal (región transentorrinal) y entorrinal del giro parahipocampal (estadio I), éstos se extienden a la región CA1 del hipocampo (estadio II), después los ovillos se acumulan en regiones límbicas como el subículo (estadio III), la amígdala, el tálamo y el claustró (estadio IV), hasta que, finalmente, los NFTs se extienden por todas las áreas isocorticales, afectando más temprana y severamente las áreas asociativas (estadio V) que las áreas sensoriales primarias, motoras y visuales (estadio VI). Además, esta degeneración sigue un patrón también laminar dentro de cada región, de manera que se encuentran afectadas primeramente las capas superficiales II, III y IV de la corteza perirrinal y entorrinal, el estrato piramidal de CA1 y subículo, y las capas III y V de las áreas isocorticales (McKhann et al. 2011; Braak et al. 2006).

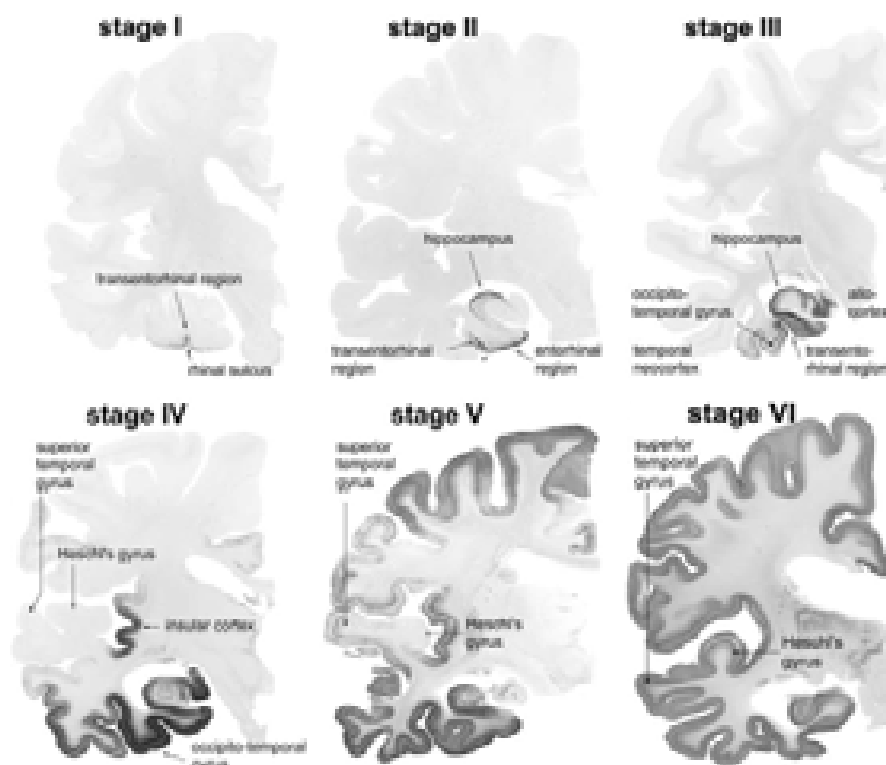


Figura 1.2. Estadios de Braak I-VI. Secciones coronales de hemisferios de individuos que muestran los seis estadios en los que progresan los cambios neurofibrilares asociados a la proteína tau hiperfosforilada, detectados mediante inmunotinción para fosfo-tau. Tomado de Braak et al. 2006.

Placas seniles

Las placas seniles o amiloides son agregados proteicos extracelulares formados mayoritariamente por el péptido β -amiloide, que se deposita tanto en el parénquima cerebral como en la pared de los vasos sanguíneos debido a sus propiedades hidrofóbicas y de agregación. Otros componentes de las placas son proteoglicanos, moléculas inflamatorias, moléculas séricas, iones metálicos, moléculas amiloidogénicas (como ApoE), proteasas, proteínas de defensa antioxidante y colinesterasas (Atwood et al. 2002).

Las placas seniles se clasifican en varios tipos según su morfología, composición o si presentan o no distrofias neuríticas asociadas, y aunque son muy diversas las clasificaciones propuestas (Thal et al. 2006, 2008; revisado en Duyckaerts et al. 2009; D'Andrea y Nagele 2010; Castellani et al. 2010; Perl 2010; Serrano-Pozo et al. 2011), se pueden resumir los diferentes tipos en (Fig. 1.3):

- Placas neuríticas: Los depósitos amiloides que se forman en los pacientes de Alzheimer pueden estar asociados con distrofias en axones y dendritas del neuropilo circundante que, por efecto tóxico probablemente de la placa, éstos se curvan y se engrosan formando lo que se conoce como neuritas distróficas. Las placas neuríticas suelen estar asociadas al reclutamiento de células microgliales reactivas y además, se relacionan con el deterioro cognitivo, encontrándose mayoritariamente este tipo de placas en los pacientes dementes. Las neuritas distróficas pueden acumular en su interior APP, ubiquitina, fosfo-tau, vesículas autofágicas, vesículas sinápticas, etc., debido al fallo en el transporte axonal que se produce en consecuencia a la desestabilización de la red del citoesqueleto. Estas neuritas distróficas pueden tener un origen glutamatérgico, gabaérgico así como colinérgico. Las placas conocidas como placas clásicas son un tipo de depósito neurítico compuesto por un núcleo denso de $A\beta_{42}$ fibrilar (por la conformación en lámina β que adquiere la estructura amiloide) y un halo de amiloide difuso. Las placas primitivas son esféricas y presentan una inmunotinción homogénea, están también compuestas por amiloide fibrilar y se asocian con neuritas distróficas.

- Placas difusas: También denominadas pre-amiloides, no son fibrilares. Son estructuras amorfas, con límites poco definidos y sin núcleo compacto. Tampoco se observan ni glía ni neuritas distróficas a su alrededor. Individuos control sin síntomas de demencia pueden presentar una gran carga de amiloide difuso en la corteza.

A diferencia de lo que ocurre con los ovillos neurofibrilares, las placas se acumulan principalmente en la corteza. Y aunque el patrón espacio temporal de progresión del amiloide es más variable, se podría decir que en general, la alo corteza (que incluye la corteza entorrinal, perirrinal y la formación hipocampal) está menos afectada que la corteza asociativa. Pese a la pobre predicción de la deposición de $A\beta$, se han propuesto dos sistemas diferentes de clasificación, el propuesto por

Braak y Braak (1991) y el propuesto por Thal y colaboradores en 2002 (Thal et al. 2002). Braak y Braak distinguen tres fases: fase A, los depósitos extracelulares afectan a las porciones basales de los lóbulos frontal, temporal y occipital; fase B, el A β se extiende hacia todas las áreas isocorticales de asociación, mientras que el hipocampo se encuentra someramente afectado y la corteza sensorial, motora y visual primaria se encuentran libres de depósitos: en la fase C, el A β finalmente se deposita en las áreas isocorticales primarias, en la capa molecular del cerebelo así como en el estriado, tálamo, hipotálamo y núcleo subtalámico.

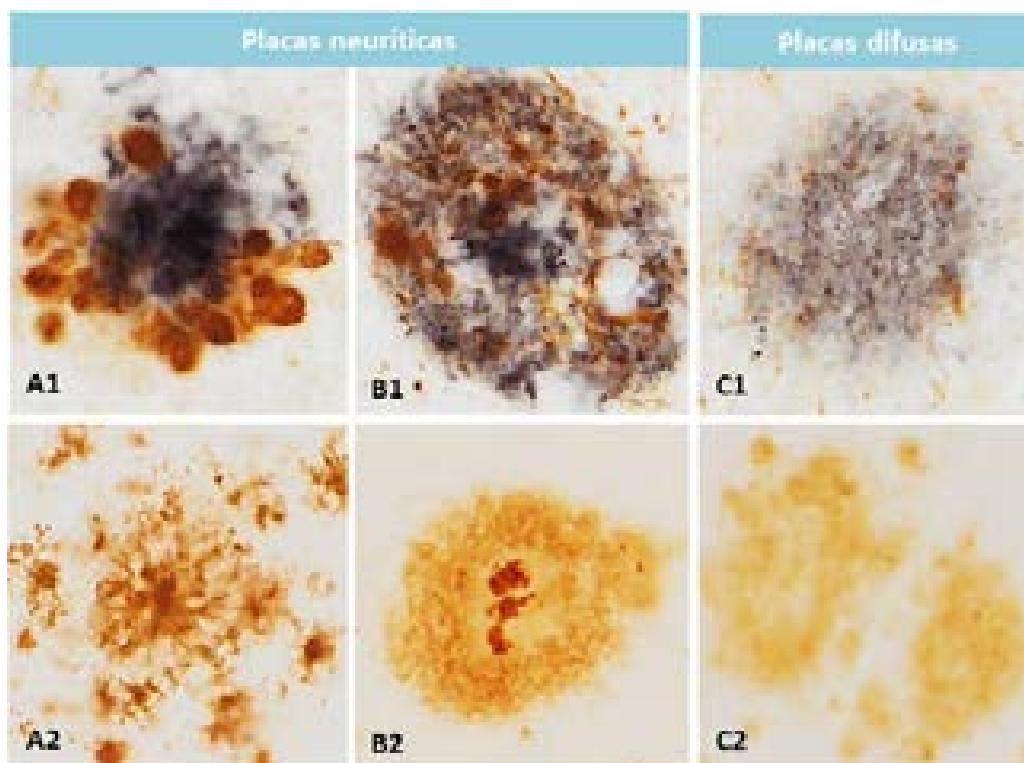


Figura 1.3. Diferentes tipos de placas seniles que desarrollan los pacientes de Alzheimer. Las placas neuríticas pueden ser de tipo fibrilar (o placas primitivas) (A1 y A2), o clásicas (B1 y B2) con núcleo denso compuesto principalmente por A β 42 (B2) y un halo difuso. Las placas difusas (C) no provocan distrofias neuríticas (C1) y presentan una morfología indefinida (C2). Inmunohistoquímica doble para A β (azul) y fosfo-tau (marrón) (A1-C1) e inmunotinción simple para A β 42 (A2-C2).

Sin embargo Thal y colaboradores definen cinco fases o estadios: estadio 1 o isocortical; estadio 2, con depósitos también en regiones alocorticales (corteza perirrinal, corteza entorrinal, hipocampo, amígdala y corteza insular y cingulada); estadio 3, con implicación también del estriado, los núcleos colinérgicos, el tálamo, hipotálamo y la sustancia blanca; estadio 4, caracterizado por afectar a la sustancia negra, la formación reticular, el bulbo raquídeo y el colículo superior e inferior; por último, en el estadio 5, los depósitos se expanden hasta el puente (formación reticular, núcleo del rafe y el *locus ceruleus*) y la capa molecular del cerebelo. Estas cinco fases de Thal se pueden resumir en la fase isocortical, la fase límbica o alocortical, y la fase subcortical (Fig. 1.4).

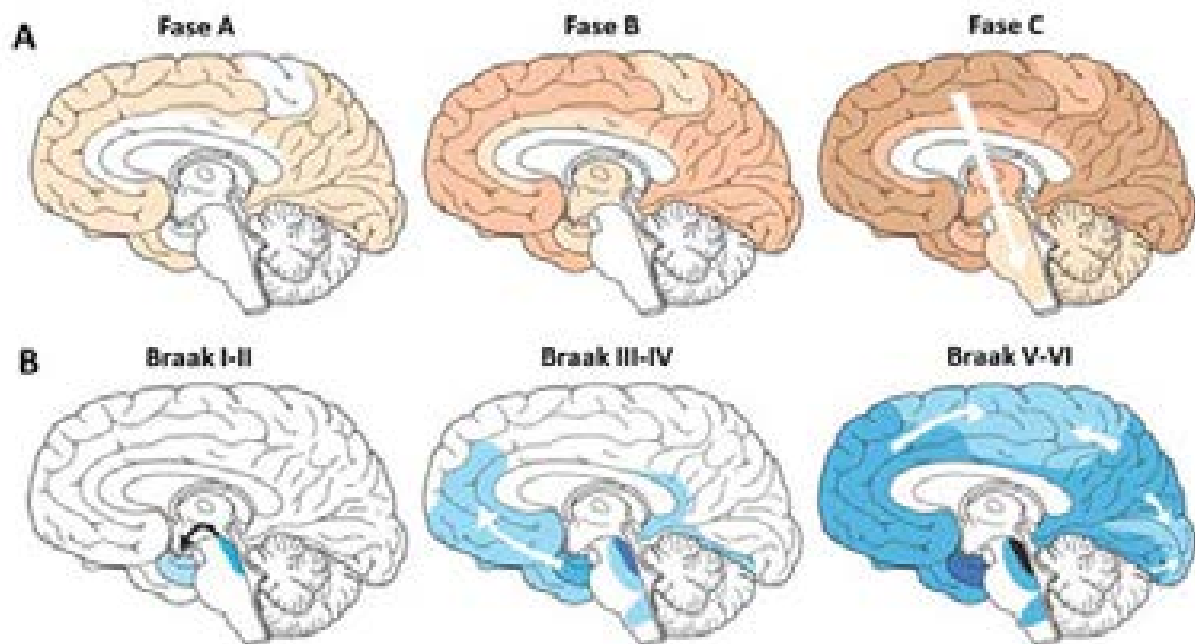


Figura 1.4. La acumulación de agregados de Abeta y fosfo-tau siguen un patrón topográfico determinado. A, según Thal, las placas amiloides aparecen primero en la neocorteza (fase isocortical), seguida de la allocorteza (fase límbica) y por último en regiones subcorticales (fase subcortical). B, según Braak, los ovillos neurofibrilares se desarrollan primero en la corteza perirrinal, se extienden a la amígdala e hipocampo hasta interconectar con las regiones neocorticales. Tomado de Jucker y Walker, 2011.

Diversos estudios han puesto de manifiesto la existencia de lesiones histopatológicas características de la AD en una proporción relevante de individuos asintomáticos (Schneider et al. 2009; Wharton et al. 2011; SantaCruz et al. 2011; Perez-Nievas et al. 2013). Dichas lesiones se presentan de acuerdo con un patrón progresivo que sugiere la existencia de fases neuropatológicas sucesivas, previas a la manifestación clínica de la enfermedad (Jicha et al. 2012). Así mismo, se han definido distintos biomarcadores que permiten detectar la patología preclínica de la AD (niveles proteicos en el líquido cefalorraquídeo –LCR–, y estudios de neuroimagen por resonancia magnética nuclear –MRI–, y tomografía por emisión de positrones o PET). En este contexto, el *International Working Group for New Research Criteria for the Diagnosis of Alzheimer’s Disease* (Cummings et al. 2013) ha propuesto designar mediante el término “enfermedad de Alzheimer” la totalidad de la enfermedad *in vivo*, incluyendo sus fases preclínicas, y referirse a los casos confirmados mediante estudio histológico (ante o post mortem) como “AD comprobada neuropatológicamente”. De forma similar, el *National Institute of Aging-Alzheimer’s Association de Estados Unidos* recomienda el término “cambio neuropatológico de AD” para referirse a los hallazgos histopatológicos característicos de la enfermedad, independientemente del estado cognitivo del individuo (Montine et al. 2012; Hyman et al. 2012).

1.2. PROTEÍNA TAU HIPERFOSFORILADA

Los ovillos neurofibrilares (NFTs) (Fig. 1.5) son estructuras histopatológicas localizadas en el interior neuronal, a modo de red compacta, constituidas por pares de filamentos helicoidales (PHF) cuyo principal componente es la proteína tau hiperfosforilada (ver revisión Ballatore et al. 2007; Gendron y Petrucelli 2009).

Tau es una proteína asociada a los microtúbulos (MAP) que interviene en el ensamblaje y estabilización de éstos, además de servir de unión a otros filamentos del citoesqueleto, por lo que es una proteína crítica en la supervivencia celular, ayudando a mantener la estructura interna de la célula. En el cerebro sano, el equilibrio entre fosforilaciones y desfosforilaciones de tau modula la estabilidad del citoesqueleto y por tanto, la morfología y el transporte axonal. Sin embargo, en el cerebro de un paciente de Alzheimer, la proteína tau se encuentra hiperfosforilada, presentando modificaciones estructurales y conformacionales, lo que afecta a su unión con la tubulina y, por lo tanto, al ensamblaje de los microtúbulos y forma agregados intracelulares que provocan disfunción neuronal. Las principales kinasas implicadas en la fosforilación anómala de tau son la quinasa dependiente de ciclina (Cdk5/p35) y la quinasa glucógeno sintasa (GSK3 β) (ver revisiones Maccioni et al. 2001; Blennow et al. 2006; Ballatore et al. 2007; Kolarova et al. 2012; Gendreau y Hall 2013).

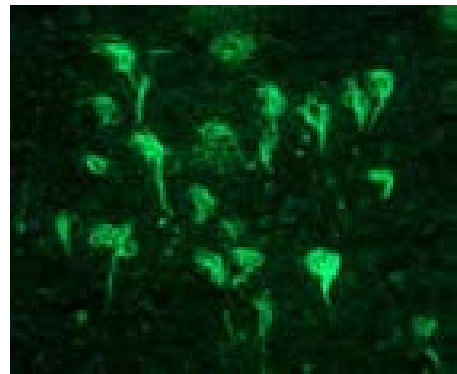


Figura 1.5. Ovillos neurofibrilares intracelulares en un sección de cerebro de un paciente de Alzheimer Braak V-VI. Tinción con Tioflavina S.

El A β , el estrés oxidativo o factores como p25, inducen un cambio en la ruta de señalización que conduce a una desregulación de la quinasa Cdk5, lo que conlleva la fosforilación anómala de tau. Cdk5 controla también indirectamente la fosforilación de tau al regular a la quinasa GSK3- β , y a su vez ciertos tipos de fosforilación de tau por parte de Cdk5 incrementan la acción de GSK3- β (Castro-Alvarez et al. 2014). En definitiva, la hiperfosforilación de tau evita su incorporación a los microtúbulos, favoreciendo la formación de pares de filamentos helicoidales y, finalmente, los ovillos neurofibrilares (NFTs o *tangles*) (ver revisiones Maccioni et al. 2001; Blennow et al. 2006; Ballatore et al. 2007). Esto provoca la degeneración del transporte axonal y la consiguiente pérdida sináptica, generación de neuritas distróficas y muerte neuronal (Iqbal y Grundke-Iqbal 2008; Iqbal et al. 2010; Frost et al. 2015).

Las enfermedades que presentan agregados intracelulares de tau se denominan tautopatías y se pueden diferenciar según la composición y morfología de los filamentos y la distribución de los mismos dentro del cerebro. Para formar los ovillos, la proteína tau hiperfosforilada se disocia de los microtúbulos y se trasloca del axón al soma y las dendritas, donde se ensambla en forma de pares de

filamentos helicoidales que constituyen las unidades estructurales de los ovillos. Son muchas las evidencias que sugieren que la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer es debida a una alteración en el citoesqueleto, y se relaciona la muerte neuronal con la presencia de ovillos neurofibrilares (Spires-Jones et al. 2009) y por lo tanto, con la demencia (Nelson et al. 2012). De hecho, en los enfermos de Alzheimer existe un patrón de deposición de los ovillos, que comienza en la corteza entorrinal y avanza hacia el hipocampo y corteza asociativa, afectándose en estadios avanzados las áreas sensoriales primarias (Braak y Braak 1991). Sin embargo, cada vez son más los estudios que atribuyen las propiedades tóxicas de la proteína tau a las formas solubles oligoméricas de ésta más que a los agregados fibrilares en forma de NFTs. Los modelos de tauopatías además de presentar fallos en el transporte axonal y dendrítico por la desestabilización de la red microtubular, cursan con una gran cantidad de déficits a nivel sináptico que incluyen pérdida sináptica, disminución de la densidad de espinas dendríticas, disminución de proteínas sinápticas y del receptor de glutamato AMPA y NMDA, así como disfunción de la transmisión LTP. Aunque los mecanismos en los que se produce esta degeneración sináptica en las tauopatías neurodegenerativas no están claro, hay muchas evidencias de que los oligómeros solubles de fosfo tau están directamente implicados. De hecho, estas especies agregadas solubles y tóxicas se acumulan en los sinaptosomas (fracción sináptica soluble aislada bioquímicamente) en los estadios tempranos de la enfermedad de Alzheimer, incluso antes de que se desarrollen los primeros ovillos neurofibrilares.

Por lo tanto, las formas oligoméricas solubles de fosfo tau, al igual que los oligómeros de A β (ver más adelante) pueden causar disfunción sináptica y muerte celular independientemente a la agregación fibrilar, con una gran implicación sobre la función sináptica y el deterioro cognitivo que cursa de manera común en todas las enfermedades neurodegenerativas y en especial, en la enfermedad de Alzheimer.

1.3. PÉPTIDO β -AMILOIDE

1.3.1. La proteína precursora amiloide (APP)

El gen que codifica para APP está constituido por 18 exones que por *splicing* alternativo dan lugar a 10 isoformas de entre 563 y 770 aminoácidos (Evin y Weidemann 2002). Las tres principales son la APP695, APP751 y APP770, siendo la primera la que encontramos con mayor frecuencia en el sistema nervioso (Nalivaeva y Turner 2013). APP pertenece a su vez a una familia de proteínas con una secuencia muy conservada entre las que se encuentran APLP1 y APLP2 (del inglés, *Amyloid precursor-like protein*).

El APP (Fig. 1.6.) es una glucoproteína integral de membrana que posee un dominio extracelular N-terminal globular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular corto (Turner et al. 2003). La región que forma el A β tras el procesamiento del APP se encuentra tanto en el dominio extracelular como en el transmembrana, lo que provoca que el β -amiloide tenga propiedades agregativas, ya que una parte de la molécula tiene características hidrofóbicas.

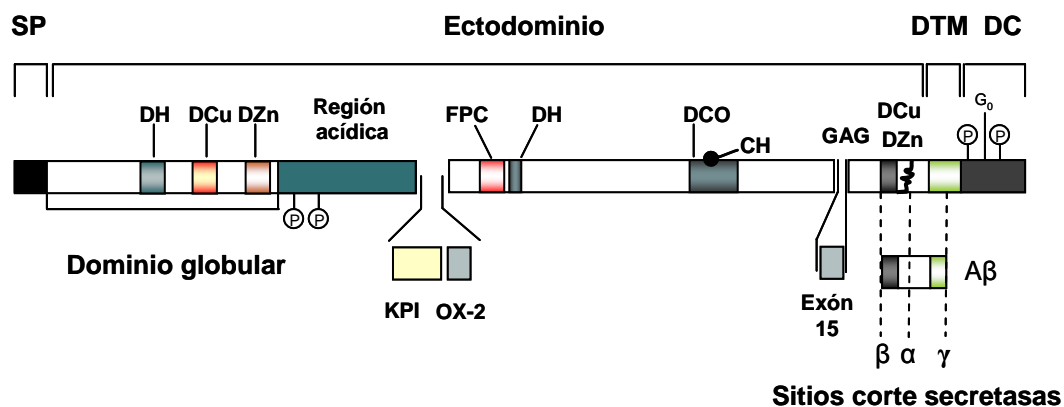


Figura 1.6. Representación esquemática de la proteína APP. Se muestra el dominio A β , varios dominios funcionales y los sitios de corte de las secretasas. *PS*, péptido señal; *DTM*, dominio transmembrana; *DC*, dominio citosólico; *DH*, dominio de unión a heparina; *DCu*, dominio de unión a Cobre; *DZn*, dominio de unión a Zinc; *FPC*, factor promotor de crecimiento; *DCO*, dominio de unión a colágeno; *CH*, sitio de incorporación de carbohidratos; *GAG*, sitio de incorporación del glicosaminoglicano condroitín sulfato; *G₀*, sitio de unión de la proteína heterotrimérica *G₀*; *KPI*, dominio inhibidor de serina proteasa tipo Kunitz; *OX-2*, secuencia que se encuentra en APP₇₇₀. Figura adaptada de Evin y Widemann 2002.

Esta proteína puede localizarse en la membrana plasmática, en la red trans Golgi, en el retículo endoplasmático, los lisosomas o la membrana mitocondrial (revisado en Rajendran y Annaert 2012). La función fisiológica de APP se desconoce hasta el momento, entre otros motivos por la redundancia de función de APLP1 y APLP2 aunque existen evidencias de que podría estar implicado en el crecimiento de neuritas, en la migración neuronal, la homeostasis del calcio, la potenciación a largo plazo (LTP) y la señalización intracelular (Hoe y Rebeck 2008; Hiltunen et al. 2009). Además, se ha descrito que el APP puede tener un papel tanto neuroprotector como antioxidante, ya que es capaz de reducir el Cu^{2+} a Cu^{+} (Evin y Weidemann 2002; Müller y Zheng 2012).

Las mutaciones en este gen que desencadenan el Alzheimer familiar provocan la modificación en el procesamiento del APP, y un consiguiente incremento en la producción de la isoforma A β 1-42, la cuales se agregan, se acumulan en el espacio extracelular y generan las placas seniles (Evin y Weidemann 2002; Pera et al. 2013).

1.3.2. Presenilina 1 y Presenilina 2

La presenilina 1 (PS1) y la presenilina 2 (PS2) son proteínas integrales de membrana con 6-8 dominios transmembranales y los dominios N-y C-terminal citosólicos. Se localizan tanto en el retículo endoplasmático como en el aparato de Golgi, aunque también se han detectado en la membrana plasmática (Suh y Checler 2002) y en compartimentos endocíticos (Vetrivel y Zhang 2006). Entre ambas proteínas existe un 65% de homología, siendo la PS1 la que se expresa mayoritariamente.

Entre sus funciones destacan el control de la apoptosis, la inducción de señales intercelulares cuando se encuentran unidas a APP, homeostasis del calcio, crecimiento neurítico, plasticidad

sináptica e intervienen en las rutas autofagocíticas/lisosomales (Lee et al. 2010) y en el procesamiento del APP. Además, poseen otros sustratos, como los homólogos del APP, Notch y sus homólogos, y un largo etcétera (revisado en Vetrivel y Zhang 2006). En concreto, las presenilinas actúan como subunidades catalíticas de la γ -secretasa o secretosoma, un complejo proteico de alto peso molecular formada por PS y otras proteínas.

Las mutaciones asociadas a la AD en los genes de la PS1 y PS2 son autosómicas dominantes y altamente penetrantes, causando un incremento en la producción de A β 1-42 y la formación de los fragmentos insolubles que se acumulan en forma de placas seniles.

1.3.3. Generación, eliminación y agregación del β -amiloide

El péptido A β , es un péptido soluble de 4 KDa, que se genera por proteólisis de la proteína precursora amiloide (APP) mediante la acción de la β - y γ -secretasas, y que circula a baja concentración tanto en sangre como en el líquido cefalorraquídeo.

No solo se genera A β a partir del procesamiento del APP, sino que se producen múltiples moléculas a las que se les ha atribuido una gran variedad de funciones. El procesamiento post-traducciona del APP puede llevarse a cabo a partir de dos vías alternativas (Fig. 1.7): la vía no amiloidogénica, en la que no se genera A β , y la vía amiloidogénica o patogénica, en la que se forman los péptidos A β 1-40 y A β 1-42.

- **Ruta no amiloidogénica:** Es la ruta principal de procesamiento del APP. La proteólisis se produce dentro de la región que da lugar al A β , evitándose así su producción. El APP es fragmentado por acción proteolítica de la α -secretasa que está anclada a la membrana, generando sAPP α , un fragmento soluble que se libera dentro del lumen vesicular o al espacio extracelular y al que se le atribuyen propiedades neuroprotectoras y neurotróficas (Mattson et al. 1993). Además, se genera un fragmento C-terminal denominado C83 (de 83 aminoácidos), que queda unido a la membrana, y que posteriormente es sustrato de la γ -secretasa. La γ -secretasa es un complejo enzimático del que forma parte la presenilina, que actúa dentro de la membrana, dando lugar a los péptidos p3 y AICD (dominio intracelular del APP, llamado también p7). Este último péptido es citosólico, por lo que podría tener un papel en la regulación de la transcripción génica.

- **Ruta amiloidogénica:** Es una ruta alternativa del procesamiento del APP, minoritaria en la mayoría de los tipos celulares (excepto en las neuronas), que genera péptidos A β . Esta vía no se produce únicamente como un proceso patológico, sino también de forma normal; de hecho A β es detectado tanto en el plasma como en el fluido cerebroespinal de individuos sanos.

Esta vía comienza con la acción de la actividad β -secretasa presente en la enzima BACE1 (enzima de corte del APP en el lugar β), una aspartil proteasa transmembrana, presente principalmente en las neuronas, específicamente en los endosomas y el aparato de Golgi, compartimentos en los que se produce el A β . La acción de esta enzima produce el fragmento sAPP β y el péptido C99 (fragmento C-terminal de 99 residuos), que permanece unido a la membrana y que

contiene la secuencia completa del A β , hasta que es sustrato de la γ -secretasa, que libera el A β de 40 ó 42 aminoácidos y el AICD (ver revisiones Selkoe 2001, 2008). Estudios recientes han determinado que el fragmento N-APP, que se produce en una situación de privación trófica a partir del producto sAPP β , puede interactuar con el receptor de muerte 6 (DR6) e inducir degeneración axonal y neuronal (Nikolaev et al. 2009).

El péptido A β puede formarse en cualquiera de los compartimentos celulares y, o bien quedarse en el interior celular, o bien salir al exterior ya se forme en la membrana celular o en la ruta secretora, la cual parece ser la vía predominante. Los endosomas, son un sitio probable de generación de amiloide, ya que la enzima BACE1 necesita un pH ácido para su actividad óptima, por lo que el APP podría ser internalizado por endocitosis desde el exterior, sin procesar, y sufrir la proteólisis en el interior del sistema endosomal.

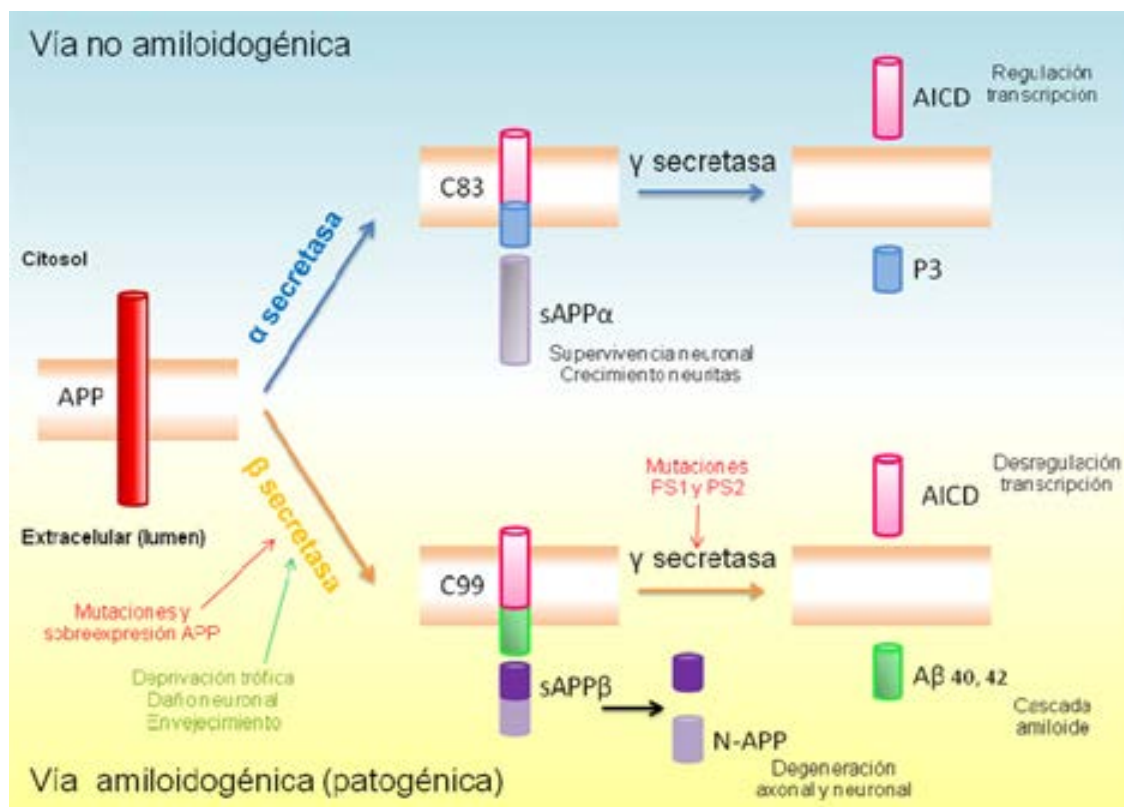


Figura 1.7. Esquema de las vías de procesamiento post-traduccional del APP. El APP puede ser procesado por la α - o la β -secretasa, según la vía, y posteriormente, la enzima γ -secretasa genera varios productos derivados del APP, como el fragmento N-APP, el A β y el AICD, los cuales realizan distintas funciones fisiológicas. Durante la enfermedad de Alzheimer, el procesamiento del APP se ve incrementado y alterado por factores genéticos como mutaciones en el APP y las PS1 y PS2 u otros mecanismos esporádicos. El resultado es un incremento en la producción de A β 1-42 y N-APP, los cuales inician una cascada de eventos neurodegenerativos. Modificado de Kim y Tsai 2009

Durante el envejecimiento normal, y de forma más acusada en la AD, se originan péptidos de A β insolubles que forman las placas seniles. El péptido A β suele terminar en Val40 (A β 1-40) en el extremo C-terminal, pero un pequeño porcentaje lo hace en Ala42 (A β 1-42), lo que hace que sea un

péptido más hidrofóbico y que tiende a agregarse y formar fibrillas. El A β 1-40 es más frecuente y es soluble en agua, mientras que el A β 1-42, que sólo constituye un 10% del A β total en los animales estudiados, es el componente mayoritario de las placas y es la forma más tóxica. Es de destacar que se ha descrito que el A β 1-42 puede interactuar con proteínas priónicas celulares (PrP), y desencadenar una vía de señalización que puede causar neuropatología (Laurén et al. 2009).

Eliminación del péptido β -amiloide

El A β puede ser degradado por diversos tipos de proteasas (revisado en De Strooper 2010): La **neprilisina** es una zinc-metaloproteasa endopeptidasa que se encuentra anclada a la membrana plasmática, capaz de eliminar el A β insoluble asociado a la membrana, tanto en su forma monomérica como oligomérica, reduciendo así la formación de placas (Marr y Hafez 2014). La disminución de los niveles de neprilisina, que ocurre durante el envejecimiento (Farris et al. 2007) genera un aumento de A β .

La **enzima degradadora de insulina** o IDE es una tiol metaloproteasa que reconoce sustratos con estructura en hoja β -plegada y aparece como una proteína soluble citosólica, aunque también puede encontrarse tanto en la superficie celular como en membranas intracelulares. Es capaz de degradar el A β , pero sólo en su forma monomérica.

Las **enzimas convertidoras de endotelina** (ECE1 y ECE2) actúan en compartimentos subcelulares como los endosomas tardíos y los autolisosomas. Su mal funcionamiento conduce a un aumento en los niveles de A β , aunque aún no está claro su mecanismo de acción (Pacheco-Quinto y Eckman 2013). La **catepsina B**, localizada en los lisosomas, parece estar implicada en la degradación de formas monoméricas y fibrilares (Mueller-Steiner et al. 2006; De Strooper 2010).

Por último, se ha implicado también a las **células gliales** (microglía y astrogliá), que reducirían los niveles de A β mediante fagocitosis y la secreción de enzimas proteolíticas (Lee y Landreth 2010).

El péptido A β no sólo puede eliminarse vía degradación enzimática por proteasas, sino que puede ser transportado a través de la barrera hematoencefálica y ser absorbido por la sangre mediante el receptor de LDL (LDLR); el drenaje perivascular junto con otros solutos del líquido intersticial a lo largo de los capilares y arterias juega también un papel importante en la eliminación del A β cuando el mecanismo vía LRP falla o cuando los niveles de neprilisina se reducen (ver revisión Weller et al. 2008). Con la edad, los niveles de neprilisina, IDE y LDLR disminuyen, y el drenaje perivascular falla por los cambios que acontecen en las paredes de los vasos sanguíneos, por lo que se produce un incremento en la difusión de A β hacia los espacios extracelulares.

Agregación del β -amiloide

Los **monómeros** de A β (especialmente de la isoforma A β 1-42), tienden a agregarse secuencialmente en dímeros, trímeros, oligómeros y protofibrillas, a medida que se acumulan. Los

oligómeros solubles, también llamados ADDLs (*Amyloid- β derived diffusible ligands*), son estructuras no fibrilares, hidrosolubles y con propiedades neurotóxicas (Lambert et al. 1998). Una vez que las estructuras prefibrilares superan los límites de solubilidad, se depositan en forma de fibrillas amiloideas y placas seniles.

Se ha descrito que las placas, ante determinados cambios en el ambiente que las rodea, pueden comportarse además como entes dinámicos liberadores de las formas oligoméricas solubles tóxicas (Martins et al. 2008; Koffie et al. 2009).

Actualmente, está establecido que la carga de placas amiloides no se correlaciona bien con la severidad de la patología, es decir, con el deterioro cognitivo del paciente. Sin embargo, se ha descrito la existencia de formas tóxicas solubles y difusibles de A β oligomérico, capaces de difundir por el parénquima cerebral, provocando pérdida sináptica y neuronal y conllevando a fallos cognitivos severos, incluso podrían ser causantes de los daños más tempranos de la AD (Haass y Selkoe 2007; Viola y Klein 2015). Los agregados extracelulares insolubles amiloides parecen estar rodeados por un gran número de oligómeros más pequeños y difusibles (Martins et al. 2008), por lo que ambos tipos de amiloide podrían estar implicados en los daños neuronales y las disfunciones sinápticas.

Existen varios tipos de A β oligomérico soluble, como las protofibrillas, que son formas intermedias que pueden polimerizar a fibras o despolimerizarse a oligómeros más pequeños, con estructura de lámina β plegada (Walsh et al. 1997); las estructuras anulares, con forma de anillo, distinguibles de los anteriores sólo a microscopía electrónica de alta resolución (Lambert et al. 1998); y los ligandos difusibles derivados del A β (ADDLs), que son hexámeros, octámeros y dodecámeros (Lambert et al. 1998); los cuales han sido obtenidos de pacientes de AD en muestras *post mortem* y cuyos niveles se correlacionan bien con los fallos cognitivos.

Estas formas oligoméricas solubles de A β pueden inhibir el mantenimiento de la LTP en el hipocampo e interferir en la señalización de los receptores NMDA o AMPA en la membrana sináptica provocando internalización de los receptores NMDA mediante endocitosis (Haass y Selkoe 2007; Viola y Klein 2015). Además, pueden inducir cambios en la membrana neuronal y glial, conllevando a la alteración de las vías de señalización, perturbación de la homeostasis del calcio, producción de especies reactivas de oxígeno, provocar cascadas inflamatorias y disfunciones mitocondriales.

1.3.4. La hipótesis clásica de la cascada amiloide y nuevas posturas

La teoría de la cascada amiloide clásica (Hardy y Allsop 1991; Hardy y Higgins 1992) propone que el depósito del péptido β -amiloide es el evento inicial en la AD y el que desencadena la patología, provocando la formación de los ovillos neurofibrilares, la muerte celular, y finalmente, la demencia (Fig. 1.8). Sin embargo, existen pacientes que aunque no tienen deterioro cognitivo, presentan una gran acumulación de placas amiloides (Perez-Nievas et al. 2013). Además, la aparición tanto de placas seniles como de los ovillos se produce en momentos y áreas cerebrales diferentes. Los ovillos aparecen antes en la corteza entorrinal y el hipocampo que en el resto de zonas afectadas,

mientras que en otras regiones aparecen en primer lugar los depósitos de A β , lo que podría indicar que se desarrollan de forma independiente (Armstrong 2006).

Según la hipótesis de la cascada amiloide (Fig. 1.8), determinados cambios en el metabolismo del A β incrementarían los niveles de A β 1-42 (por sobreproducción y/o fallo en la eliminación), que tiende a oligomerizarse. Dichos oligómeros tienen capacidad de difusión y actividad cito- y sinaptotóxica, por lo que se producen alteraciones sinápticas y celulares. Conforme se van formando las primeras fibrillas de péptido β -amiloide se daría la aparición de neuritas distróficas. Ante estos estímulos, se activa una respuesta neuroinflamatoria mediada principalmente por astrogliía y microglía. Además, la actividad de determinadas quinasas (por ejemplo GSK3- β ; (Krafft y Klein 2010)) también se ve afectada por el A β , siendo una de las consecuencias la hiperfosforilación de la proteína tau provocando, por un lado, su acumulación en NFTs y por otro, fallos en el transporte axonal, también responsable de la patología neurítica y disfunción sináptica. Por último, la cascada finalizaría con la muerte neuronal y un estado progresivo de demencia (revisado en Haass y Selkoe 2007).

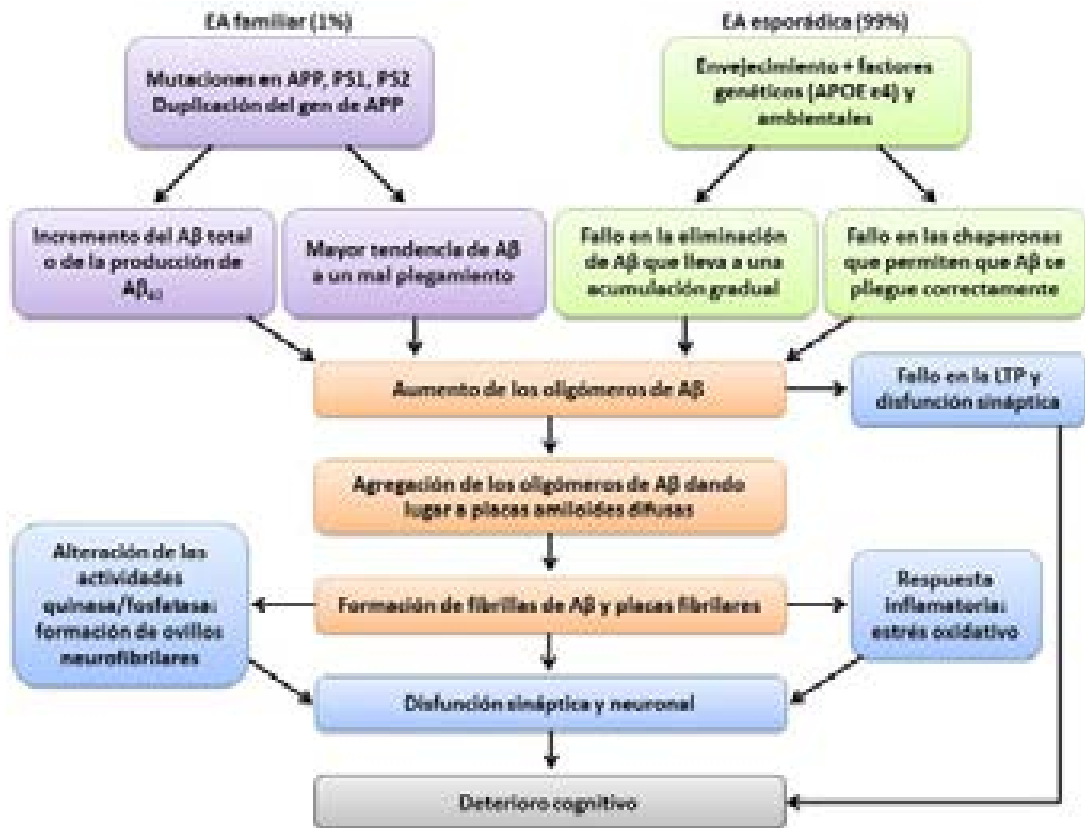


Figura 1.8. Hipótesis de la cascada amiloide. La acumulación gradual de A β en el cerebro, ya sea en la enfermedad de Alzheimer de tipo familiar o de tipo esporádico, desencadena una serie de eventos patológicos conocidos como la cascada amiloide. Las placas amiloides y los oligómeros de A β provocan alteraciones que llevan a la activación de la respuesta inflamatoria, a la formación de ovillos neurofibrilares y a una pérdida sináptica y neuronal, lo cual causa deterioro cognitivo progresivo. Modificado de Blennow et al. 2010.

Actualmente, la hipótesis original, que concedía un papel central al efecto de la deposición extracelular, ha sido revisada otorgándole mayor importancia al rol que juegan estos oligómeros tóxicos. Por último, el descubrimiento de la presencia de estas formas oligoméricas asociadas a la periferia de los depósitos extracelulares, y del carácter dinámico de las placas (Martins et al. 2008; Koffie et al. 2009), está promoviendo la reconsideración de las formas fibrilares como reservorio/fuente de oligómeros tóxicos al medio, dando pie a la reconciliación entre la hipótesis clásica y la oligomérica.

1.4. NEURODEGENERACIÓN: PATOLOGÍA NEURÍTICA, PÉRDIDA NEURONAL Y SINÁPTICA

1.4.1. Patología neurítica

Las neuritas distróficas, definidas como prolongaciones neuronales engrosadas o irregulares, consecuencia de una alteración del citoesqueleto y fallo en el transporte, son una de las principales lesiones neurodegenerativas encontradas en los cerebros de pacientes de la enfermedad de Alzheimer, y se las ha correlacionado con la demencia característica de este proceso neurodegenerativo. En humanos se ha descrito ampliamente como las neuritas distróficas están clásicamente asociadas a las denominadas placas compactas (Geddes et al. 1986; Masliah et al. 1991; Su et al. 1993; Dickson et al. 1999). Estas distrofias rodean las placas neuríticas. Los estudios de inmunotinción y ultraestructurales sugieren que la mayor parte de las distrofias son de origen axonal ya que se tiñen con neurofilamentos pero no con MAP2, y contienen marcadores sinápticos. Además, datos de nuestro grupo han revelado la naturaleza presináptica de muchas de estas distrofias (Sanchez-Varo et al. 2012).

En concreto, la aparición de distrofias axonales ha sido extensamente descrita en el hipocampo y la corteza entorrinal de pacientes de AD, tanto en estadios tempranos como tardíos (Su et al. 1993; Dickson et al. 1999; Dickson y Vickers 2001; Bell y Claudio Cuello 2006). Estos procesos alterados han mostrado ser inmunopositivos para un gran abanico de marcadores relacionados con todo tipo de funciones neuronales (proteínas sinápticas, citoesqueléticas, APP, ubiquitina, y un largo etcétera) (Cras et al. 1991; Dickson et al. 1999).

Del mismo modo, la presencia de estas neuritas distróficas también ha sido observada en muchísimos modelos de la AD (Boutajangout et al. 2004; Delatour et al. 2004; Adalbert et al. 2009; Dawson et al. 2010) incluyendo el modelo APP/PS1 empleado en este trabajo (Blanchard et al. 2003; Ramos et al. 2006; Moreno-Gonzalez et al. 2009; Baglietto-Vargas et al. 2010; Sanchez-Varo et al. 2012; Torres et al. 2012; Trujillo-Estrada et al. 2014).

Además, estudios a nivel ultraestructural en muestras de pacientes de AD han demostrado la existencia de grandes acúmulos de vesículas de naturaleza autofágica (vía endocítica-autofágica-lisosomal) a nivel de estas neuritas distróficas, fenómeno que ha sido igualmente observado en

algunos modelos animales (Nixon 2007; Nixon y Yang 2011; Sanchez-Varo et al. 2012; Torres et al. 2012; Trujillo-Estrada et al. 2014). Todo ello apunta a la disfunción en estos sistemas como un evento contribuyente a esta patología.

Sin embargo, el mecanismo de formación de estas distrofias así como su relación con los depósitos extracelulares de A β no han sido esclarecidos aún. De este modo, existen autores que consideran su aparición previa a la de las placas (Gouras et al. 2005; Stokin 2005; Fiala 2007), mientras que otros datos apuntan hacia el orden cronológico inverso (Geddes et al. 1986; Meyer-Luehmann et al. 2008).

1.4.2. Pérdida neuronal y sináptica

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la pérdida de neuronas y sinapsis en la corteza cerebral y en ciertas regiones subcorticales. Existe una importante disminución del número de neuronas, que afecta principalmente al área CA1 del hipocampo (Price et al. 2001; Hof et al. 2003) y a la capa II de la corteza entorrinal (Gomez-Isla et al. 1996; Kordower et al. 2001; Price et al. 2001; Hof et al. 2003). El lóbulo temporal es especialmente susceptible a la AD, mientras que las áreas motoras y sensoriales permanecen sin daños (Thompson et al. 2003). Otras regiones donde se ha establecido pérdida neuronal son el bulbo olfatorio y el núcleo olfatorio anterior, la amígdala, el núcleo basal de Meynert (grupo colinérgico que inerva el hipocampo, la amígdala y la neocorteza), la parte medial de la sustancia negra, la parte rostral del locus cerúleo (grupo noradrenérgico que conecta con la corteza entorrinal y el hipocampo), y el núcleo del rafe serotoninérgico (ver revisiones Mufson et al. 2003; Heneka y O'Banion 2007; Duyckaerts et al. 2009; Castellani et al. 2010). La causa de esta muerte neuronal selectiva es materia aún de controversia. La formación de ovillos neurofibrilares intracelulares ha sido asociada con la pérdida neuronal, al igual que la toxicidad del A β (ver revisión Duyckaerts et al. 2009; Spires-Jones y Hyman 2014).

Los modelos animales transgénicos para la enfermedad de Alzheimer recapitulan algunas de las características histopatológicas observadas en los pacientes, pero no todas, ya que la mayoría de estos modelos presentan escasa muerte neuronal (ver revisiones Philipson et al. 2010; Ashe y Zahs 2010; Perl 2010). Sin embargo, sí que se ha encontrado pérdida neuronal en los modelos murinos empleados en este estudio (descrito en apartado 1.6. de modelos murinos transgénicos). Por otro lado, la pérdida de estos tipos neuronales en los animales transgénicos coincide con la neurodegeneración que se produce en los pacientes de AD.

La pérdida de los terminales sinápticos en la enfermedad de Alzheimer se correlaciona mejor con los déficits cognitivos que con la carga de β -amiloide extracelular o la pérdida neuronal, especialmente en las fases iniciales de la patología (Arendt 2009; Bayer y Wirths 2010; Palop y Mucke 2010). Los análisis neuropatológicos han confirmado una pérdida de inmunoreactividad de sinaptofisina en los terminales sinápticos en la capa molecular externa del giro dentado y en la corteza frontal de pacientes de Alzheimer. De todas las áreas analizadas, el hipocampo parece ser la

más afectada por la pérdida de proteínas sinápticas mientras que la corteza occipital es la menos vulnerable. Es de destacar que la reducción en las proteínas de las vesículas sinápticas en la EA se relaciona con los primeros síntomas clínicos de demencia (Terry et al. 1991; Dickson et al. 1995; Masliah et al. 2001; Chang et al. 2013). La patología sináptica en los pacientes de Alzheimer se refleja en una pérdida de los principales componentes de las vesículas sinápticas que alojan a los neurotransmisores, junto con la disminución de componentes moleculares de compartimentos pre- y post-sinápticos y grandes cambios patológicos de la sinapsis (ver revisión Arendt 2009). Estas alteraciones de la maquinaria sináptica también han sido descrita en distintos modelos de la enfermedad (Rutten et al. 2005; Sanchez-Varo 2011; Mitew et al. 2013).

Se ha demostrado que el A β oligomérico está involucrado en la reducción de la densidad de espinas dendríticas en pacientes y en modelos transgénicos (Moolman et al. 2004; Jacobsen et al. 2006), así como en la pérdida y disfunción sináptica en general tanto *in vivo* como *in vitro* (Shankar et al. 2007; Shankar y Walsh 2009; Viola y Klein 2015).

1.5. RESPUESTA NEUROINFLAMATORIA

En la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, incluida la AD, se produce una reacción neuroinflamatoria mediada principalmente por componentes de la respuesta inmune innata, en la que participan la microglía (macrófagos del cerebro) y la astrogliía (Latta et al. 2014; Heneka et al. 2014, 2015a, 2015b; Heppner et al. 2015). La respuesta inmune adaptativa y la infiltración de linfocitos T se da en menor grado en la enfermedad de Alzheimer. Cuando el agente desencadenante es un patógeno o una célula dañada, esta respuesta inflamatoria es necesaria para la supervivencia del organismo; pero cuando se produce de manera aberrante o crónica, puede llegar a causar graves daños. Sin embargo, los tipos celulares y moléculas que intervienen en la inflamación tienen otras funciones fuera de esta respuesta, variando el sentido de moléculas pro- y anti-inflamatorias (Rubio-Perez y Morillas-Ruiz 2012; Zhang y Jiang 2015). Estudios genéticos, realizados en miles de pacientes (GWAS), han demostrado una clara asociación entre la AD y mutaciones en genes directamente implicados en la respuesta inmune (Karch et al. 2014). Dentro de los genes candidatos, y aparte del locus de APOE, estos estudios han identificado mutaciones en TREM2, CD33 y HLA (ver revisión Lambert et al. 2013). Tanto TREM2 como CD33 están implicados en la activación y/o internalización microglial del Abeta (Bradshaw et al. 2013; Guerreiro et al. 2013; Lue et al. 2014; Griciuc et al. 2013; Hickman y El Khoury 2014) por lo que su alteración podría suponer una disminución en la capacidad de fagocitosis de este péptido. Sin embargo, el papel que desempeña la activación microglial en el desarrollo de la patología no es conocido (Streit et al. 2014). Queda por determinar si la neuroinflamación es una consecuencia secundaria al proceso patológico que ocurre en la AD, o es una de las causas que podrían provocar su aparición y desarrollo.

1.5.1. Microglía

El SNC presenta su propio sistema inmune, formado por células inmunocompetentes propias denominadas células microgliales o microglía. Son células de soporte y protección de las neuronas y constituyen, aproximadamente, un 10% de las células del SNC. La microglía un importante papel en el cerebro no solo en proteger de los posibles patógenos sino que también interviene en el mantenimiento de los circuitos neuronales, contribuyendo a la protección y remodelación de las sinapsis. Una vez que son activadas por eventos patológicos, como el daño neuronal o agregados proteicos, la microglía es capaz de migrar hacia la zona dañada e iniciar una respuesta inmune. En la AD, las células microgliales son capaces de unirse a las formas solubles oligoméricas de A β así como a las fibras amiloides a través de receptores de membrana como SCARA1, CD36, CD14, α 6 β integrina, CD57, y TLRs (del inglés *toll-like receptors*). Se piensa que este proceso forma parte de la reacción inflamatoria que tiene lugar en la AD. Una vez que el A β se ha unido a las células microgliales a través de estos receptores, comienza una reacción en cadena que comienza con la producción de factores proinflamatorios como citoquinas y quimiocinas (ver revisiones Zhang y Jiang 2015; Cai et al. 2015; Heppner et al. 2015; Heneka et al. 2015a, 2015b)

Eliminación del A β

En respuesta a esta unión receptor-ligando, la microglía comienza el proceso de fagocitosis en un intento de eliminar las fibras de A β (Lee y Landreth 2010; Doens y Fernández 2014; Tang y Le 2015). Las fibras de A β entrarían al interior celular por la ruta endolisosomal, sin embargo, son resistentes a la degradación enzimática. El péptido A β soluble sí que puede degradarse mediante proteasas extracelulares, como la neprilisina o la enzima degradadora de insulina (IDE) (ver revisión De Strooper 2010), que son las más importantes. En la AD, que se acumula una gran cantidad de placas seniles, capacidad microglial fagocítica es insuficiente, por lo que se piensa que la disminución en la expresión de receptores de fagocitosis provoca el incremento en la concentración de citoquinas. De hecho, en apoyo a esta hipótesis se han identificado varias mutaciones con pérdida de función en TREM2, receptor de la microglía implicado en la fagocitosis, como factor de riesgo de la AD (Guerreiro et al. 2013; revisiones Hickman y El Khoury 2014; Lue et al. 2014). De la misma manera, mutaciones en el receptor de superficie de la microglía CD33 provoca una reducción en los procesos fagocíticos así como un incremento en la acumulación de A β (Griciuc et al. 2013; Bradshaw et al. 2013; ver revisión Heppner et al. 2015).

Activación microglial

Las células de la microglía se activan rápidamente ante cualquier daño y pueden diferenciarse a distintos fenotipos, un fenotipo alternativo (M2), inducido por diferentes mediadores, como IL-4 e IL-13 y caracterizado por las funciones de fagocitosis y por la producción de citoquinas con capacidad neuroprotectora; y un fenotipo clásico (M1), caracterizado por la producción de

citoquinas inflamatorias (IL1 β , TNF α) y especies reactivas de oxígeno (revisado en Mosher y Wyss-Coray 2014; Li et al. 2014; Cai et al. 2015). A día de hoy existen dudas sobre si la microglía adopta estrictamente un solo fenotipo, y sobre los factores que hacen que la microglía cambie de un fenotipo a otro (Gomez-Nicola y Perry 2014).

Activación microglial clásica o proinflamatoria (M1)

Las células microgliales activadas clásicamente, en respuesta a la secreción de las citoquinas IFN γ TNF α producen una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno, óxido nítrico (NO) y citoquinas y quimiocinas proinflamatorias (TNF α , IL1 β , IL6, IL12, IFN γ , FASL, TRAIL y CH3L1 (Varnum y Ikezu 2012). La finalidad de esta respuesta es el mantenimiento de una inflamación proinflamatoria tóxica para acabar con el agente patógeno causante de la activación. Sin embargo, el mantenimiento prolongado en el tiempo de esta respuesta puede provocar citotoxicidad neuronal y crear un círculo vicioso en el que implicarían distintas células del sistema inmune innato, potenciando la respuesta clásica proinflamatoria (ver revisiones Cherry et al. 2014; Tang y Le 2015).

Activación microglial alternativa o antiinflamatoria (M2)

La respuesta alternativa inhibe la activación clásica y promueve la reparación del tejido y la recuperación de la homeostasis, mediante la liberación de moléculas antiinflamatorias y factores de crecimiento (Imai et al. 2007; Chhor et al. 2013). Según los mediadores responsables de su activación y los marcadores característicos que expresan las células microgliales, el fenotipo M2 se clasifica a su vez en tres subtipos (ver revisiones Colton et al. 2006; Cherry et al. 2014; Latta et al. 2014; Tang y Le 2015) (ver figura representativa 1.9).

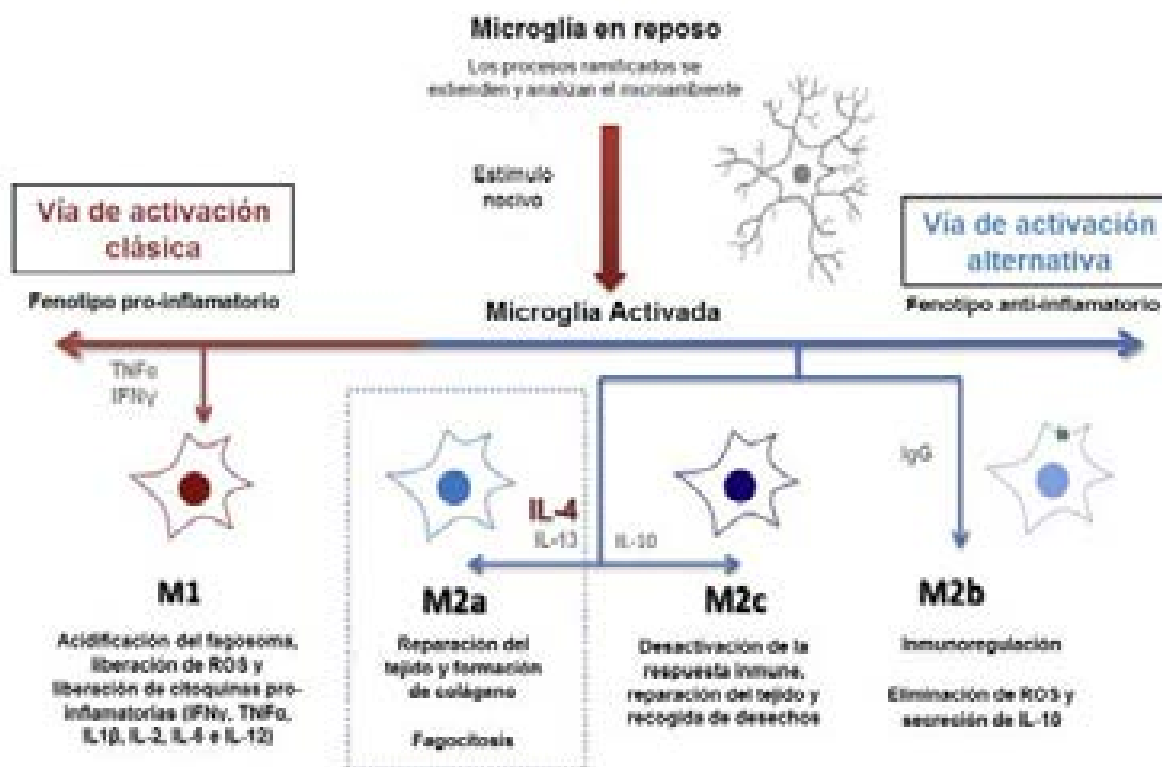


Figura 1.9. Diferentes fenotipos de activación de la microglía. La microglía puede variar su estado fenotípico de activación (clásico o alternativo) en función del tipo de respuesta neuroinflamatoria que se necesite. *IgG*: Inmunoglobulina G, *IL*: Interleucina, *TNF α* : factor de necrosis tumoral alfa, *IFN γ* : interferón-gamma, *ROS*: especies reactivas de oxígeno. Modificado de Latta et al. 2014.

- **M2a**: se induce por IL4 e IL13 a través de los receptores TLR, generando un aumento en la expresión de marcadores como Arg-1 (Arginasa-1, enzima hidrolasa que participa en el ciclo de la urea, extinguiendo el sustrato de la enzima NOS e inhibiendo así la producción de NO), IGF-1 (*Insulin growth factor-1*), IL-4, IL-13 y MRC-1 (*Mannose receptor-1*) entre otros. Todos estos marcadores evitan que se genere una respuesta inflamatoria y mantienen un entorno neuroprotector. Este fenotipo además se caracteriza por presentar capacidad fagocítica, necesaria para la eliminación del patógeno y de los restos celulares que hayan quedado como resultado de una respuesta inflamatoria citotóxica. Algunos de los receptores implicados en la fagocitosis son MSR-1 (*macrophage scavenger receptor 1*), SiRP β 1 (*Signal Regulatory Protein β -1*) y CD36.
- **M2b**: la activación de este fenotipo es dependiente del inmuno-complejo, los TLRs y/o el receptor IL1R (revisado por Boche et al., 2013). Se caracteriza por la falta de expresión de marcadores típicos M2, aunque presentan una expresión alta de IL10 y baja de IL12, característico de una polarización M2. Este fenotipo, además, se ha relacionado con la activación de linfocitos Th2.
- **M2c**: esta activación se produce en respuesta a IL10 y TGF β , dos potentes citoquinas antiinflamatorias. La actividad de estas células se asocia a una función remodeladora y reguladora de la respuesta inmune, que se pone en marcha una vez que las células polarizadas a M1 han hecho su función. TGF β además se ha asociado a una mayor capacidad fagocítica de la microglía. A pesar de estar dividido en tres grupos, el fenotipo M2 tiene una función conjunta que es neutralizar al agente causante de la lesión sin dañar al tejido cerebral.

En humanos y en animales transgénicos de la AD se ha observado la existencia de distintos tipos de activación microglial, pudiendo ocurrir un cambio durante la progresión de la enfermedad (Hanisch y Kettenmann 2007; Jimenez et al. 2008). En este sentido, nuestro grupo de investigación ha descrito la existencia de un cambio, dependiente de la edad, del fenotipo microglial en el hipocampo del modelo APP/PS1, de modo que a edades tempranas, los depósitos amiloides inducen una activación microglial alternativa, antiinflamatoria, con función, posiblemente, neuroprotectora; y a edades avanzadas, la microglía que no está asociada a las placas, se activa de forma clásica, expresando factores citotóxicos como el TNF α (Jimenez et al. 2008). La activación clásica es coincidente en el tiempo con la neurodegeneración de las neuronas piramidales en el hipocampo de este modelo animal. Es de destacar que en la corteza entorrinal de este modelo transgénico, la respuesta inflamatoria es de naturaleza citotóxica a edades tempranas (6 meses de edad) y que coincide también con la muerte de las neuronas principales en esta región cortical (Moreno-Gonzalez et al. 2009). El hecho de que a una misma edad cronológica la respuesta inflamatoria tenga un perfil totalmente distinto en dos de las regiones cerebrales más afectadas por la patología amiloide (neuroprotectora en el hipocampo y citotóxica en la corteza entorrinal) podría ser la base de los

datos contradictorios obtenidos con el tratamiento con fármacos antiinflamatorios en pacientes de Alzheimer (Meinert et al. 2009; Breitner et al. 2011; Jaturapatporn et al. 2012). Sin embargo, actualmente existe información contradictoria sobre el balance entre los procesos pro y antiinflamatorios que se producen en los enfermos de Alzheimer o acerca de la inducción celular y temporal de la cascada inflamatoria producida por el péptido A β .

1.5.2. Células mieloides del sistema inmune cerebral

El SNC presenta una gran cantidad de componentes inmunológicos a parte de las células microgliales derivados de células mieloides, como los macrófagos de las meninges y del plexo coroideo así como los macrófagos y monocitos perivascuales (ver revisiones Ransohoff y Cardona 2010; Heneka et al. 2015b; Walker y Lue 2015; Greter et al. 2015; Heppner et al. 2015). Recientemente, se ha descrito que los macrófagos perivascuales presentan también un papel importante en la eliminación del péptido de A β para proteger de la patología amiloide (Butovsky et al. 2014; Jay et al. 2015). Los macrófagos perivascuales, al contrario que la microglía, en la edad adulta éstos se están continuamente renovando a partir del *pool* de monocitos circundantes. Son muchos los estudios que han demostrado que estas células mieloides perivascuales son capaces de activarse y promover la fagocitosis de las placas limitando la acumulación de Abeta alrededor de los vasos (revisado en Heppner et al. 2015). Por lo tanto, en la actualidad se piensa que los macrófagos infiltrados, derivados de monocitos perivascuales, podrían también contribuir y modular la patología de Alzheimer.

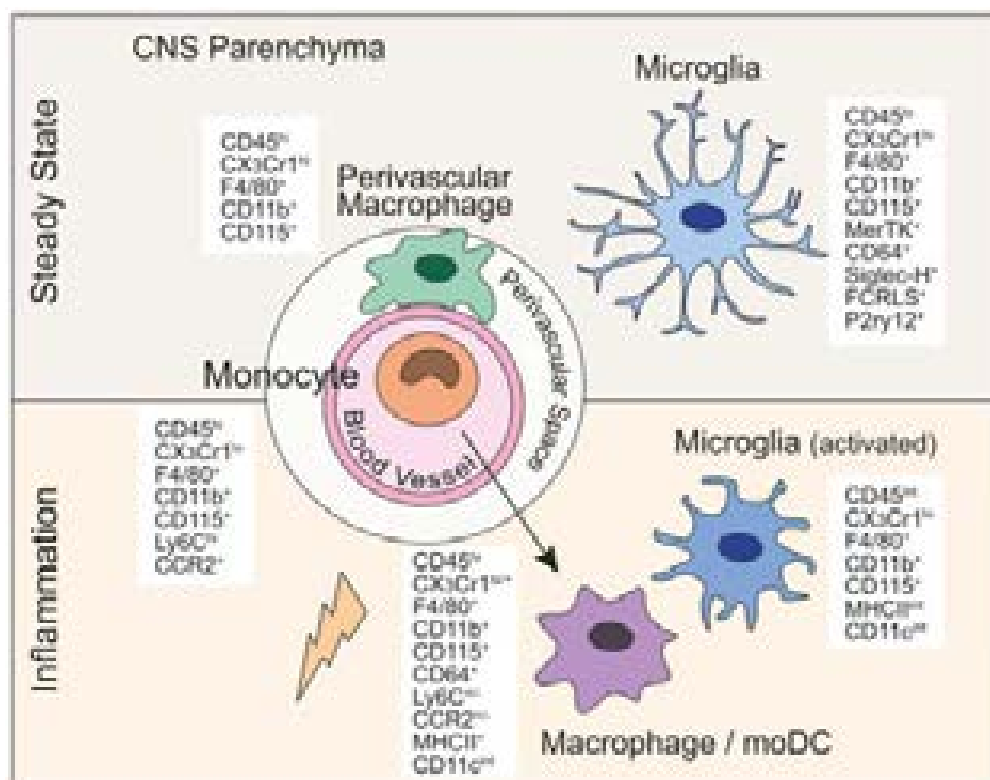


Figura 1.10. Células mieloides del Sistema Nervioso Central y sus marcadores específicos en estado quiescente y activado. Los macrófagos periféricos pueden distinguirse de la microglía por su fenotipo $CCR2^+/CD45^{high}$ (entre otros). La microglía a su vez, en estado quiescente presenta un fenotipo $CD45^{lo}/CX3CR1^{hi}/P2ry12^+$. La microglía reactiva además, puede regular la expresión de estos marcadores y presentar un fenotipo diferente, caracterizado por $CD45^{int}/CX3CR1^{hi}/P2ry12^-$. Tomado de Greter et al. 2015.

Diferenciar la microglía según su morfología o fenotipo del resto de poblaciones de células mieloides es complicado debido a un origen común, por lo que la mayoría de marcadores comúnmente empleados en el estudio de la respuesta inflamatoria son expresados tanto por células microgliales como por monocitos/macrófagos periféricos. Sin embargo recientemente, el transcriptoma y los análisis de epigenética han identificado determinados genes que son expresados y regulados por las poblaciones de macrófagos, y viceversa (ver figura 1.10) (Hickman et al. 2013; Butovsky et al. 2014; Greter et al. 2015).

1.5.3. Astroglía

Otro tipo celular implicado en los procesos neuroinflamatorios es la astroglía, células gliales del SNC que se caracterizan por expresar la proteína glial fibrilar ácida (GFAP), vimentina y nestina (revisado en Sofroniew y Vinters 2010; Verkhratsky et al. 2014; Phillips et al. 2014; Heppner et al. 2015). Entre sus funciones principales se encuentran proporcionar soporte metabólico a las neuronas y participar en el mantenimiento y desarrollo de las sinapsis. También intervienen en la reparación del tejido nervioso dañado cuando se produce una lesión, aislándola, y cooperando con la microglía. Además, los astrocitos rodean a los capilares sanguíneos en el cerebro, regulando las propiedades de la barrera hematoencefálica, y conformando la lámina glial que se interpone entre las meninges y el tejido nervioso (Sofroniew y Vinters 2010).

La activación de los astrocitos también es característica de la AD (Phillips et al. 2014; Heneka et al. 2014; Heppner et al. 2015; Heneka et al. 2015a, 2015b); se manifiesta desde los primeros estadios de la enfermedad (Carter et al. 2012) y progresa significativamente a medida que lo hace la patología amiloidea y tau. Sin embargo, la función de los astrocitos reactivos es, a día de hoy, bastante desconocida. El término “reactivo” es insuficiente para definir si los astrocitos contribuyen a la patología de la AD mediante ganancia o pérdida de función tóxica, o si, por el contrario son protectores, o incluso tienen funciones diferentes en función del estado de la patología y/o de su localización regional, o de la distancia de los astrocitos respecto a las placas de $A\beta$. Estudios preclínicos en modelos transgénicos han demostrado resultados contradictorios. La inhibición/depleción de $\alpha1$ ACT (Mucke et al. 2000), calcineurina (Furman et al. 2012; Fernandez et al. 2012), CD40L (Tan et al. 2002), o TNF α (Green y LaFerla 2008) revierten la formación de placas y su toxicidad asociada, indicando que la activación de los astrocitos implica aumento de toxicidad. Por el contrario, la supresión de la expresión de GFAP/vimentina, en vez de disminuir la patología neuronal la incrementa, produciendo un aumento en el número de neuritas distróficas alrededor de las placas. Estos últimos datos sugieren un papel neuroprotector.

Los astrocitos están implicados en la eliminación del A β y forman una barrera protectora entre los depósitos del péptido β -amiloide y las neuronas. En la AD, la presencia de un gran número de astrocitos asociados a las placas amiloides sugiere que el tejido dañado genera moléculas quimiotácticas que median el reclutamiento de astrocitos, los cuales secretan moléculas pro-inflamatorias al igual que la microglía (Morales et al. 2014). Por otro lado, los astrocitos también pueden contribuir a la deposición extracelular del A β , ya que sobreexpresan BACE1 en respuesta a un estrés crónico. Por lo tanto, aunque todavía no se ha puesto de manifiesto si la activación astrogliar contribuye a la generación de las placas o a su eliminación, sí que se ha demostrado que contribuyen a la inflamación. Además, la astroglía expresa la enzima sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), por lo que consecuentemente, contribuye a la neurotoxicidad medida por el óxido nítrico (NO) (ver revisión Heneka y O'Banion 2007).

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 por ejemplo A β evitando su acumulación.

Por tanto, estas células gliales podrían adoptar un espectro de fenotipos funcionales dependiendo del contexto patológico.

1.6. MODELOS TRANSGÉNICOS MURINOS DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La búsqueda de un modelo apropiado para desentrañar los mecanismos y encontrar tratamientos para la enfermedad de Alzheimer, ha llevado a los investigadores a trabajar con una gran variedad de modelos animales (desde gusanos a osos polares). Así, se han generado modelos de EA con invertebrados que presentan una vida media de dos meses, y hasta con grandes mamíferos como primates no humanos con una vida media de 50 años en cautividad. Sin embargo, ha sido el ratón el que ha proporcionado mayores hitos científicos en la AD.

Actualmente, no existe ningún modelo animal de la forma esporádica de la AD, que representa más del 95% de los casos, por lo que una buena aproximación es el empleo de animales transgénicos que porten las mutaciones encontradas en los pacientes de la forma familiar, ya que ambos tipos de Alzheimer cursan con las mismas características neuropatológicas. Los más empleados son los modelos transgénicos murinos, que comenzaron a generarse en 1990, y continúan a día de hoy siendo esenciales en la investigación de esta enfermedad (ver revisiones Woodruff-pak 2008; Lee y Han 2013; Webster et al. 2014; Bilkei-Gorzo 2014). Estos modelos animales, permiten estudiar la evolución de la enfermedad desde los estadios más tempranos, y conocer así los cambios

neuropatológicos y los mecanismos celulares y moleculares que podrían desencadenar la enfermedad.

En el caso de los humanos, basta una única mutación en el gen del APP o las PS para padecer la enfermedad. Sin embargo, todavía no existe un modelo de ratón que albergue una única variante genética ligada a la enfermedad de Alzheimer y que por sí sola desarrolle un déficit cognitivo progresivo, placas, ovillos neurofibrilares y la pérdida neuronal característica de humanos. Aunque no se disponga de un modelo completo de la AD, existen modelos de ratón muy valiosos como herramienta para el estudio de su patogénesis (ver los más utilizados en la Tabla 1.1 ; ver revisiones Duyckaerts et al. 2008; Kokjohn y Roher 2009; Morrisette et al. 2009; Elder et al. 2010; Bilkei-Gorzo 2014; Webster et al. 2014).

1.6.1. Modelos monogénicos

Tras el descubrimiento de las mutaciones inductoras de la FAD, se generaron diversos modelos basados en la sobreexpresión de transgenes con dichas mutaciones, y controlados por distintos promotores. El primer modelo desarrollado para la AD fue PDAPP, basado en la expresión del transgen **APP** humano que contenía la mutación *Indiana* (V717F). Independientemente, pero con un enfoque similar, se generó después el modelo Tg2576 que sobreexpresaba un transgén APP humano con la mutación *swedish* (K670N/M671L). Los modelos basados en mutaciones en APP manifiestan la típica patología amiloide, con placas neuríticas, aunque su inicio es algo tardío, y no suelen presentar muerte neuronal (Elder et al. 2010)

A su vez, existen varias líneas transgénicas que se basan en mutaciones en los genes de **PS1** y **PS2**. Los ratones transgénicos para PS muestran notables elevaciones de A β 1-42, y sin embargo, no desarrollan placas. El por qué no está claro, pero podría relacionarse con los niveles generalmente bajos de A β en comparación con las líneas de APP. También puede estar relacionado con las propiedades de agregación diferentes del A β de ratón frente al de origen humano.

Por otro lado, para poder estudiar la relación de la enfermedad con los NFTs, ha sido necesario desarrollar modelos murinos con el gen de la proteína **tau** humana mutada (paradójicamente no existen mutaciones de tau asociadas con el desarrollo de AD, aunque sí con otras enfermedades como la demencia frontotemporal y el Parkinson). Éstos sí desarrollan NFTs, pérdida de memoria y fallos motores. Los modelos *knock-out* para la proteína tau no presentan trastorno aparente (Van Dam y De Deyn 2011).

1.6.2. Animales bigénicos y trigénicos

La generación de los modelos APP y PS1 también ha permitido la creación de las líneas de **dobles transgénicos o bigénicos APP/PS**; en estos casos, las mutaciones de las PS provocan que la formación de placas sea más temprana y severa que en los modelos monogénicos APP (Elder et al. 2010). Por ejemplo, el modelo AP/PS (Borchelt et al. 1997) presenta la doble mutación APP sueca

bajo el promotor de prión murino y la forma humana de la presenilina 1 mutada (hPS1-A246E). Este modelo a los 9 meses presenta la misma cantidad de depósitos extracelulares que los animales que portan sólo la mutación APP sueca a los 18 meses de edad.

En este apartado únicamente describiremos en profundidad los dos modelos bigénicos APP/PS que se han empleado en este trabajo:

- **APP751SL/PS1M146L**: generado por Blanchard y col., en 2003, al cruzar los transgénicos PS1 (M146L, bajo el promotor HMG-CoA reductasa) con ratones APP (hAPP751 con la doble mutación *Swedish* (K670N y M671L) y la mutación *London* (V717I) bajo el promotor Thy1) (Blanchard et al. 2003). Este modelo animal se caracteriza por presentar un inicio bastante temprano de la aparición de depósitos extracelulares (3-4 meses) principalmente en hipocampo, corteza entorrinal y subículo (Ramos et al. 2006; Caballero et al. 2007; Moreno-Gonzalez et al. 2009; Trujillo-Estrada et al. 2014), así como una respuesta inflamatoria con astrogliosis y microgliosis desde los 4-6 meses (Jimenez et al. 2008; Moreno-Gonzalez et al. 2009; Trujillo-Estrada et al. 2014). La patología neurítica ocurre a edades tempranas (4-6 meses) siendo principalmente de tipo axonal/presináptico (Sanchez-Varo et al. 2012; Trujillo-Estrada et al. 2014, 2013) y está acompañada de la alteración de los sistemas de proteólisis intracelular dependiente de lisosomas y del proteasoma (Torres et al. 2012). Aunque hasta la fecha no se han encontrado NFTs en este modelo al menos hasta los 18 meses de edad, sí que presenta tau hiperfosforilada desde los 4 meses de edad (Sanchez-Varo et al. 2012; Torres et al. 2012; Trujillo-Estrada et al. 2013, 2014). Las deficiencias cognitivas aparecen antes de los 9 meses de edad (Trujillo-Estrada et al. 2013). A diferencia de la mayoría de los modelos, presenta una muerte neuronal temprana y selectiva de interneuronas GABAérgicas desde los 4-6 meses de edad (Ramos et al. 2006; Moreno-Gonzalez et al. 2009; Baglietto-Vargas et al. 2010; Trujillo-Estrada et al. 2014). Además, también ocurre la muerte de neuronas piramidales a edades tempranas (Moreno-Gonzalez et al. 2009; Trujillo-Estrada et al. 2014), y en el caso del hipocampo a los 17 meses, en los últimos estadios cuando hay una fuerte presencia de formas oligoméricas solubles (Jimenez et al. 2008, 2011).

- **APP/PS1dE9**: En este modelo (Jankowsky et al. 2004), los depósitos extracelulares de A β aparecen a partir de los 4-6 meses de edad, aumentando progresivamente durante el envejecimiento, siendo abundantes en el hipocampo y en la corteza a los 9 meses de edad, y aumentando hasta los 12 meses (Garcia-Alloza et al. 2006). Este modelo también presenta astrogliosis y microgliosis desde edades muy tempranas (4-6 meses), especialmente alrededor de las placas (Ruan et al. 2009) así como déficits cognitivos a los 12 meses de edad (Volianskis et al. 2010). Aunque no desarrolla ovillos neurofibrilares intracelulares y la muerte neuronal es modesta, sí que presenta anomalías neuríticas (Garcia-Alloza et al. 2010), pérdida de actividad neuronal localizada (Meyer-Luehmann et al. 2009) y déficits en la transmisión sináptica colinérgica y glutamatérgica (Minkeviciene et al. 2008; Machová et al. 2010).

Por último, con el objetivo de estudiar de forma más profunda la relación entre tau y las otras proteínas, se han desarrollado ratones dobles transgénicos **APP/tau** y **triples**

APP/PS1/tau en los cuales las placas aparecen antes que los ovillos, apoyando la hipótesis de la cascada amiloide (Oddo et al. 2003).

Tipo de animal	Línea	Mutación	Características
APP	PDAPP	APP _I	Placas desde los 6 meses. Neuritas distróficas y pérdida sináptica. Astroglisis y microglisis. No NFTs. No pérdida neuronal.
	Tg2576	APP695 _S (_{KM670/671_{NL}})	Placas desde 9-11 meses. Pérdida sináptica y de memoria. No NFTs. No pérdida neuronal.
	APP23	APP751 _S (_{KM670/671_{NL}})	Placas desde los 6 meses. Neuritas distróficas, hiperfosforilación de tau. Gliosis. Afectación aprendizaje y memoria espacial. Muerte neuronal en hipocampo. No NFTs.
	C3-3	APP _S	Sin placas amiloides
	CRND8	APP _{SI}	Placas desde los 3 meses. Incremento de Aβ ₄₂ /Aβ ₄₀
	APP Dutch	hAPP751 _D	Incremento de Aβ ₄₂ /Aβ ₄₀ . Angiopatía amiloide cerebral, hemorragias; microglisis y astroglisis perivascular. Neuritas distróficas. No NFTs.
	hAPP695	hAPP695SL inducible	Con la inhibición génica el tamaño de los depósitos amiloides no se reduce.
	SweDI	hAPP _{SDI}	Angiopatía amiloide cerebral a los 3 meses. Microglisis y astroglisis. Niveles elevados de citoquinas proinflamatorias. Fallos cognitivos tempranos.
	APParc	hAPParc	En ratones viejos, depósitos congofílicos vasculares y parenquimáticos. Las hembras presentan déficits en aprendizaje y memoria espacial, y una acelerada patología amiloide.
PS1	S9	PS1dE9	Incrementa la formación de placas
	S8-4	HuPS1	Sin depósitos extracelulares
	N-5	hAPP A246E	Sin depósitos extracelulares
	PS1 _{KO}	Sin PS1	Inviabile
	ALZ27	Sobreexpresión de 4 repeticiones de tau (4R)	Axonopatía. No NFTs

Tipo de animal	Línea	Mutación	Características
TAU	8c	Expresión de tau humana	Tau en neuritas y sinapsis, no en somas
	hTau	TauKOx8c	Muerte neuronal. Sin NFTs
	P301L	Tau P301L	Sin muerte celular. NFTs de aparición temprana
	P301S	Tau P301S	Fallos sináptico (3 meses) Microgliosis. Muerte celular. NFTs a edades tempranas
	V337M	4R V337M	NFTs desde los 6 meses
	rTg4510	4R P301L inducible	NFTs y pérdida neuronal
	DM-hTau	2-3-4R Tau K257T/P301S	NFTs desde los 6 meses
APP/PS	AP/PS	C3-3xN-5 APP _S Y HuPS1 A246E	Depósitos extracelulares desde los 9 meses
	PSAPP	Tg2576 (695 _S) y PS1 (M146L)	Con placas desde los 6 meses de edad, en lugar de a los 9 meses como el Tg2576
	APP/PS1	PS1 (M146L) y APP _{SL}	Depósitos extracelulares desde los 3-4 meses. Patología neurítica. Gliosis. Muerte de neuronas piramidales e interneuronas.
	APP _{SL} PS1 _{KI}	APP (751 _{SL}) y PS1 _{KI} (M233T/L235P)	Patología muy agresiva. Pérdida de neuronas en CA1 a los 10 meses.
	5xFAD	APP _S , APP _F , APP _L , PS1 (M146L y L286V)	Niveles altos de Aβ ₄₂ (1,5 meses). Placas extracelulares (2 meses). Pérdida neuronal (9 meses)
	PS1dE9/APP _S	PS1 (Δexón9) y APP (K _M 670/671 _{NL})	Depósitos extracelulares desde los 4-6 meses. Gliosis. Muerte neuronal.
APP/TAU	TAPP	Tg2576 x TauJNPL3	Placas desde 8,5 meses. NFTs.
	APP _S /tau _{V_{LLW}}	APPs x tau	Placas desde los 9 meses. NFTs desde los 25 meses. Muerte neuronal a los 16 meses.
APP/PS1/TAU	3xTg-AD	PS1 _{KI} (M146L), APP _S , tau (P301L)	NFTs desde los 9 meses. Placas desde los 6. Aβ intracelular en neuronas piramidales de CA1. Disfunción sináptica.
	PS1/APP/tau	PS1(M146L), APP751 _{SL} , hTau (3R)	Acumulación somatodendrítica de tau. Depósitos extracelulares a los 2,5 meses. Axones distróficos. No NFTs.

Tabla 1.1 Modelos murinos transgénicos para el estudio de la enfermedad de Alzheimer (modelos empleados para este estudio destacados en negrita). AD: Alzheimer's disease, D: mutación Dutch, hAPP: APP humano, I: Mutación Indiana, INs: interneuronas, KI: Knock in, KO: Knock out, NFT: ovillos neurofibrilar intracelular, S: Mutación Swedish, SL: mutaciones Swedish y London, SDI: Swedish, Dutch e Iowa, SFL: Swedish, Florida y London, 4R: isoforma de tau con 4 repeticiones.

1.7. FORMACIÓN HIPOCAMPAL

La formación hipocampal consta de las áreas CA1, CA2, CA3 y CA4 (del latín *Cornu Ammonis*) del hipocampo propio, el giro dentado (GD) y el subículo, todos los cuales constituyen la alo corteza o arquicorteza de Brodmann. Estas regiones están altamente interconectadas y se diferencian del giro parahipocampal en que sólo poseen 3 láminas (Witter et al. 2000). El subículo de la formación hipocampal es el área de transición entre el hipocampo y la corteza entorrinal.

El giro dentado y el hipocampo propio están constituidos por tres capas, lo que es característico de la arquicorteza. La capa externa del GD se llama capa molecular y contiene axones aferentes y dendritas de las células intrínsecas de cada estructura. En el hipocampo propiamente dicho esta capa ha sido tradicionalmente dividida en dos estratos, el *stratum radiatum* y *stratum lacunosum-moleculare*. La capa media, denominada capa granular en el giro dentado y capa piramidal en el hipocampo, contiene las neuronas principales de cada estructura. La capa interna, denominada capa multiforme, posee los axones de las células piramidales y granulares, neuronas intrínsecas y muchos elementos de glía. Esta capa también recibe el nombre de *stratum oriens* en el hipocampo y de hilio en el giro dentado. 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. El fórnix es la principal vía de conexión entre el hipocampo y otras estructuras cerebrales (revisado en Per Andersen, 2007; van Strien et al. 2009).

El hipocampo propio puede dividirse en cuatro regiones a partir de diversos criterios citoarquitectónicos. Estas áreas se designan como CA1 a CA4 (de acuerdo con Lorente de Nó, 1934). El área CA1 se localiza en el límite entre el subículo y el hipocampo. Las áreas CA2 y CA3 están situadas dentro del hipocampo. El área CA4 se encuentra en la unión del hipocampo con la circunvolución dentada, pero dentro del hilio de esta última y es prácticamente indistinguible en la formación hipocampal del ratón.

A partir de ahora, denominaremos como hipocampo al conjunto formado por el hipocampo propio y el giro dentado.

El subículo se encuentra entre el área CA1 del hipocampo propio y la corteza entorrinal, y al igual que el hipocampo, presenta una organización en tres capas (Witter y Amaral 2004): capa polimórfica (la más interna, donde se encuentran las dendritas basales de las neuronas piramidales;

capa de células piramidales (donde se encuentran los somas de las neuronas piramidales o principales, con un empaquetamiento menor que el estrato piramidal del hipocampo propio); y capa molecular (la más externa del subículo, donde se encuentran las dendritas apicales de las células piramidales).

1.7. 1. Conexiones del hipocampo

Conexiones intrínsecas del hipocampo: La corteza entorrinal (CE) constituye la mayor inervación cortical del hipocampo, y lo hace mayoritariamente a través de dos vías, descritas por Cajal (1901,1911): una que discurre a través del *alveus* (vía alvear), predominante a niveles septales y que es la principal ruta por la que las fibras de la CE alcanzan su blanco en CA1. Estas fibras se desvían bruscamente en el *alveus*, perforan la capa de células piramidales y finalmente terminan en el slm de CA1 y CA3. Sin embargo, 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 et al. 2000; Witter y Amaral 2004; Ahmed y Mehta 2009). De forma breve podemos decir que desde el GD pasa a CA3 y de aquí a CA1 (revisado en Amaral y Witter 1989; van Strien et al. 2009). El circuito finaliza con la proyección desde CA1 a la CE, bien directamente o a través del *subiculum*.

Continuando con el circuito desde el GD, los axones de las células granulares, las fibras musgosas (*mossy fibers*), forman haces colaterales en el hilo y a continuación penetran en CA3, donde establecen sinapsis en *passant* en las dendritas proximales de las células piramidales. La región de CA3 localizada justamente superior a la capa piramidal, donde se encuentran las fibras musgosas provenientes del hilio, recibe el nombre de *stratum lucidum* (sl). Además, las células del hilio dan lugar al menos a dos sistemas de conexiones de asociación que terminan en el giro dentado.

Las células piramidales de CA3 poseen axones altamente colateralizados que por un lado constituyen proyecciones de asociación que terminan en CA3 (haz longitudinal de asociación), y por otro dan lugar a la mayor proyección hacia CA1, el haz colateral de Schaffer. Las células piramidales de CA1 más cercanas a CA3 reciben información de un subconjunto de células CA3 cercanas a CA2. Por el contrario, las células de CA1 más cercanas al subículo reciben inputs de las células de CA3 más cercanas al GD. Así, aunque en un principio el circuito ha sido descrito como una secuencia simple de conexiones excitadoras de una región a la siguiente formando un circuito cerrado, en realidad existen varios circuitos solapados (por ejemplo, de CE a CA3, de modo que todo se vuelve mucho más complejo) (revisado en van Strien et al. 2009).

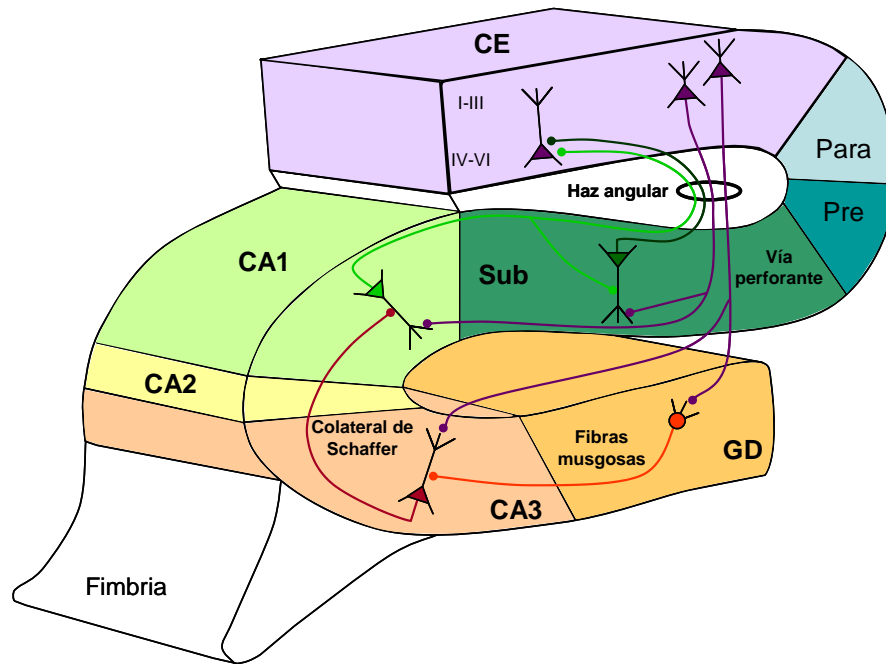


Figura 1.11. Esquema de las conexiones del circuito trisináptico. Las neuronas de la capa II de la CE proyectan hacia el GD y CA3 a través de la vía perforante. Las neuronas de capa III de la CE proyectan hacia CA1 y el subículo a través de la vía perforante y alvear. Las células granulares del GD contactan con CA3 a través de las proyecciones de las fibras musgosas. Las neuronas piramidales de CA3 viajan a CA1 a través de las colaterales de Schaffer. Las células piramidales de CA1 proyectan hacia el subículo. Tanto CA1 como el subículo proyectan hacia las capas profundas de la CE a través del haz angular. *CE: corteza entorrinal; números romanos: capas de la CE; CA1, CA2, CA3: regiones del hipocampo propio; GD: giro dentado; Sub: subículo; Para: parasubiculo; Pre: presubiculo.* Modificado de Andersen 2007.

Aferencias del hipocampo: El hipocampo no recibe información directa desde la corteza sensitiva primaria, sino indirectamente desde las cortezas asociativas. Además, al hipocampo llega información desde regiones asociadas con la atención, la emoción y la memoria por lo que se le considera como un área cerebral implicada en la integración de la información sensorial, de asociación y que participa en diferentes tipos de memoria. Así, las principales aferencias a la formación hipocámpal proceden de la CE (como ya hemos comentado, a través de la vía perforante, detallado en (van Groen et al. 2002; Witter et al. 2000; van Strien et al. 2009) y de otras estructuras límbicas como la región septal y la amígdala (ver Fig. 1.12). Más concretamente, el hipocampo recibe aferencias colinérgicas desde el encéfalo basal anterior, que provienen del septum y del núcleo vertical de la banda diagonal de Broca (Schäfer et al. 1998). Una de las principales funciones de esta proyección es la regulación de la actividad hipocámpal, concretamente de la generación y mantenimiento de los ritmos theta, y desempeña un papel importante en los procesos de memoria y aprendizaje (Dutar y Bassant 1995).

Por otro lado, el hipocampo recibe inervación desde varios núcleos del tronco cerebral que también se encuentran afectados en la AD, e igualmente ocurre con la amígdala (Pitkänen et al. 2000), que con sus aferencias participa en la correcta estructuración de los comportamientos más adecuados en función de la información sensorial disponible. Además, el hipocampo también recibe

proyecciones catecolaminérgicas, como por ejemplo, terminales noradrenérgicos provenientes del *locus ceruleus*. La afectación de estas vías en los pacientes de AD está bien documentada (ver revisiones Mufson et al. 2003; Heneka y O'Banion 2007; Duyckaerts et al. 2009; Castellani et al. 2010).

Otra fuente importante de aferencias son las fibras comisurales del hipocampo contralateral que penetran en la fimbria y se agrupan en el fórnix, los cuales están conectados dorsalmente por la comisura hipocampal.

Eferencias del hipocampo: Las proyecciones eferentes de la formación hipocampal se originan principalmente en las células del subículo y, en menor medida, en las células piramidales del HP. En ambos casos, los axones de estas neuronas entran en el *alveus*, confluyen para formar la fimbria del hipocampo y luego continúan su camino constituyendo el fórnix. Estas fibras glutamatérgicas atraviesan toda la longitud del fórnix, aunque algunas cruzan la línea media en la decusación del hipocampo justo delante al esplenio del cuerpo calloso. La mayor parte de estas fibras terminan en el núcleo mamilar medial, aunque otras llegan al hipotálamo y al tálamo. También existen proyecciones eferentes desde el subículo que se dirigen a la CE, hacia la corteza cingulada y la amígdala.

1.8. GIRO PARAHIPOCAMPAL

El giro parahipocampal (GPH) está formado por la corteza entorrinal (CE), la corteza perirrinal (CP) y la corteza parahipocampal (CPH, nombre que recibe en primates, o corteza postrinal, como se denomina en ratas) presubículo (PrS) y parasubículo (PaS). Estas áreas, a diferencia de las anteriores, poseen 6 láminas (Witter et al. 2000; van Strien et al. 2009; Blaizot et al. 2010). Cada una de estas áreas recibe conexiones de múltiples áreas neocorticales de asociación y, por lo tanto, constituye un importante lugar de convergencia de las aferencias neocorticales al hipocampo.

1.8.1. Corteza perirrinal

La corteza perirrinal (CP) forma parte de la región parahipocampal o giro parahipocampal dentro del lóbulo temporal medial, junto con la corteza postrinal (o parahipocampal), la corteza entorrinal y el pre y parasubículo. En los últimos años, la corteza perirrinal ha sido objeto de estudio en la investigación de la memoria, ya que juega un papel esencial en la memoria de reconocimiento y en el flujo de información entre el hipocampo y la neocorteza (Suzuki 1996; Burwell 2000; Suzuki y Amaral 2003; Suzuki y Naya 2014).

En 1909, Brodmann describió las cortezas que rodean al hipocampo y las distinguió como áreas 28, 35 y 36, también llamadas corteza entorrinal, perirrinal y ectorrinal respectivamente. Posteriormente se incluyeron dos nuevas regiones en la formación parahipocampal de primates,

llamadas TF y TH, conocidas hoy día conjuntamente como la corteza parahipocampal. En roedores, se ha denominado a las áreas 35 y 36 conjuntamente como corteza perirrinal y se ha redesignado la porción caudal de las áreas 35 y 36 como corteza postrinal, estructura homóloga a la corteza parahipocampal de primates (revisado en Burwell et al. 1995; Burwell 2001).

La corteza perirrinal de roedores ocupa ambos lados de la mitad caudal del surco rinal, se localiza dorsalmente a la corteza entorrinal y rostralmente a la corteza postrinal. El límite rostral de esta corteza está marcado por el claustró y el límite dorsal por la corteza temporal ventral. Además, la corteza perirrinal está formada por dos regiones, una dorsal correspondiente al área 36 y otra ventral correspondiente con el área 35, que pueden distinguirse por sus características citoarquitectónicas como el grosor de las diferentes capas y la densidad celular (revisado en Burwell et al. 1995; Burwell 2001).

La corteza perirrinal ha sido clasificada como “perialocorteza”, ya que representa una transición filogenética de la alocorteza (o arquicorteza) a la neocorteza (Furtak et al. 2007a).

Conexiones corticales de la corteza perirrinal (revisado en Furtak et al. 2007b)

- Conexiones corticales del área 36: aproximadamente la mitad de todas las aferencias del área 36 de la corteza perirrinal provienen de estructuras corticales, sobretodo de la corteza temporal, la cual proporciona la mayor entrada de conexiones (Burwell y Amaral 1998). La mayoría de las proyecciones de la corteza temporal se originan en la corteza temporal ventral que se encuentra anatómicamente adyacente al área 36 y proporciona información sensorial (auditiva, olfativa y visual). El área 36 también recibe aferencias de las regiones auditivas de la corteza temporal. Estas proyecciones de la corteza temporal terminan en todos los niveles del área 36. La corteza insular también proyecta moderadamente hacia la región rostral del área 36 representando, aproximadamente, la quinta parte de las aferencias (Burwell y Amaral 1998; Burwell 2001). Aunque la corteza occipital no conecta de manera importante con el área 36, supone un tercio de todas las entradas a la región caudal, además, una gran porción de estas proyecciones surgen de regiones de asociación visual.

En cuanto a las eferencias, el área 36 conecta de manera importante con la corteza parietal, temporal y frontal. La proyección más destacada del área 36 parte de la región rostral y termina en la corteza somatosensorial.

- Conexiones corticales del área 35: al igual que ocurre en el área 36, en el área 35, aproximadamente la mitad de todas las aferencias provienen de regiones corticales. El área 35 se encuentra altamente conectada con la corteza piriforme e insular (Burwell y Amaral 1998). Las proyecciones de la corteza piriforme terminan en la porción rostral y caudal del área 35, mientras que la corteza insular inerva toda la extensión rostro-caudal de esta región. En comparación con el

área 36, el área 35 recibe menos aferencias de la corteza temporal y éstas terminan preferentemente a nivel medio del eje rostro-caudal.

El área 35 proyecta, de manera más débil que el área 36, a estructuras corticales, siendo las proyecciones más abundantes las que terminan en las áreas frontales e insulares, aunque también proyecta de manera más moderada hacia la corteza parietal.

Conexiones hipocampales de la corteza perirrinal (revisado en Furtak et al. 2007b)

- Conexiones hipocampales del área 36: el sistema hipocampal proyecta de forma muy débil hacia el área 36 de la corteza perirrinal, y es la región parahipocampal la que proporciona las entradas más importantes dentro del sistema hipocampal. La corteza postrinal y entorrinal representan la fuente de la mayoría de las aferencias del área 36. La conexión proveniente de la corteza postrinal termina principalmente en niveles medios y caudales del área 36 mientras que las proyecciones de la corteza entorrinal lo hacen sobre niveles más rostrales. En cuanto a las aferencias que provienen del hipocampo, la mayoría se originan en la región CA1 de la división ventral del hipocampo, ya que las entradas que proporciona la división dorsal del hipocampo son prácticamente despreciables.

Las eferencias del área 36 hacia la formación hipocampal también son modestas, y éstas contactan con la región CA1 y el subículo del hipocampo dorsal y ventral. Por el contrario, el área 36 proyecta fuertemente hacia la corteza entorrinal y modestamente hacia la corteza postrinal.

- Conexiones hipocampales del área 35: al igual que ocurre con el área 36, el área 35 de la corteza perirrinal recibe muy pocas aferencias del sistema hipocampal. Sin embargo, la corteza entorrinal proporciona unas tres cuartas partes de todas las entradas provenientes del sistema hipocampal y que terminan en todos los niveles del eje rostrocaudal de área 35. Además, la región caudal del área 35 recibe una modesta cantidad de conexiones provenientes de la corteza postrinal. En cuanto a las proyecciones originadas en el hipocampo, éstas surgen en CA1 y en el subículo, y terminan en la región caudal del área 35, y son más densas las provenientes del hipocampo ventral que las del hipocampo dorsal.

Todo el eje rostro caudal del área 35 proyecta fuertemente hacia la corteza entorrinal, sin embargo, la corteza postrinal recibe una conexión moderada que se origina en la región caudal del área 35. Además, el área 35 también proyecta hacia el subículo, especialmente hacia el subículo ventral.

1.9. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO Y OBJETIVOS

Actualmente, existen en España alrededor de 800.000 personas afectadas por la enfermedad de Alzheimer, y 36 millones a nivel mundial, aunque teniendo en cuenta que tan solo 1 de 4 casos son diagnosticados, esta cifra es sin duda aún mayor (www.ceafa.es). La prevalencia de la enfermedad está por debajo del 1% en individuos menores de 65 años, pero muestra un incremento casi exponencial con la edad, y en personas de 85 años la incidencia está alrededor del 40%. Con el incremento de la esperanza de vida y la ausencia de una terapia efectiva (los escasos tratamientos disponibles son exclusivamente sintomáticos produciendo un beneficio cognitivo modesto sin efectos sobre el curso patológico de la enfermedad) se calcula que en el año 2050 esta enfermedad neurodegenerativa afectará a 130 millones de personas en todo el mundo (www.alz.org, www.alz.co.uk) convirtiendo a la AD un gran problema social, sanitario y económico que afecta no solo a los pacientes sino también a cuidadores y familiares. 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. Uno de los mecanismos patogénicos que ha ido ganando reconocimiento en los últimos años es el jugado por las células gliales (en especial las células microgliales) en los procesos inflamatorios asociados a enfermedades neurodegenerativas en general y en especial a la AD. Hasta la fecha, las estrategias terapéuticas dirigidas a modular esta respuesta inflamatoria no han tenido éxito en los pacientes. Una posible explicación a este fracaso traslacional de los datos preclínicos obtenidos en modelos a la clínica humana posiblemente sea debido a la existencia de diferencias entre modelos animales y humanos.

Nuestro grupo de investigación, perteneciente a Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED) del Instituto de Salud Carlos III, y al Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), ha caracterizado a nivel celular y molecular modelos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer con objeto de estudiar 1) mecanismos celulares/moleculares implicados en los cambios neurodegenerativos y 2) identificar potenciales biomarcadores de utilidad diagnóstica así como dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos. En colaboración con la industria farmacéutica Sanofi (Francia), durante la última década el grupo ha estudiado en mayor detalle un modelo transgénico que sobre-expresa las formas mutadas de dos proteínas implicadas en el desarrollo del Alzheimer familiar, PS1_{M146L} y APP_{751SL}. Estos animales transgénicos APP/PS1 presentan acumulación de A β extracelular desde edades muy tempranas (2 meses de edad en el subículo, Trujillo-Estrada et al. 2014; 3-4 meses de edad en el hipocampo y la corteza cerebral, Ramos et al. 2006; Moreno-González et al. 2009, respectivamente). Al igual que se

ha descrito en pacientes, la formación de placas amiloides se encuentra asociada a una respuesta inflamatoria con activación microglial y astrogial. A edades tempranas, se produce una activación microglial neuroprotectora o alternativa M2 alrededor de las placas, mientras que a edades avanzadas además se produce una activación de células microgliales en las regiones interplaca, en este caso con fenotipo citotóxico o clásico M1 caracterizado por la producción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF α (Jimenez et al. 2008; Moreno-González et al. 2009). Es de destacar que existe un incremento en los niveles de A β oligomérico soluble con la edad que acompaña a este proceso neuroinflamatorio citotóxico (Jimenez et al. 2011). Estas formas solubles de los modelos, además de estimular a la microglía, afectan directamente a las neuronas incrementando su vulnerabilidad (Carriba et al. 2015). En base a estos hechos, parece que la microglía ejercería un papel citotóxico para las neuronas en la patología de la AD.

A diferencia de la mayoría de otros modelos de la AD, este modelo APP/PS1 presenta procesos neurodegenerativos tempranos (4-6 meses de edad) que afectan, específicamente, a determinados tipos neuronales del sistema GABAérgico. En particular, en el hipocampo, en el subículo y en la corteza entorrinal, las interneuronas que expresan el neuropéptido SOM son altamente vulnerables mientras que la población que expresa la proteína ligadora de calcio parvalbúmina no se encuentra afectada (Ramos et al. 2006; Moreno-Gonzalez et al. 2009; Trujillo-Estrada et al. 2014). Además, las interneuronas que expresan calretinina, otra proteína ligadora de calcio, también son vulnerables desde edades tempranas en el hipocampo (Baglietto-Vargas et al. 2010). Por otra parte, este modelo presenta degeneración de las neuronas piramidales en el subículo (Trujillo-Estrada et al. 2014) y en la corteza entorrinal (Moreno-González et al. 2009) a edades tempranas en tanto que en el hipocampo la pérdida de neuronas glutamatérgicas ocurre a edades avanzadas, 17 meses de edad (Schmitz et al. 2004; Jimenez et al. 2008). Es de destacar que en este modelo existe también degeneración de neuronas colinérgicas en el telencéfalo basal al igual que ocurre en pacientes de EA (Trujillo-Estrada 2015, Tesis Doctoral, datos no publicados). Además, el hipocampo de estos ratones presenta una importante patología neurítica de naturaleza axonal/presináptica asociada a los depósitos amiloides con acumulación de formas hiperfosforiladas de tau y vesículas de tipo autofágico (Sánchez-Varo et al. 2012; Torres et al. 2012) tal y como se ha descrito en humanos (Nixon 2007; Nixon y Yang 2011). Este modelo APP/PS1, por tanto, recapitula varias de las lesiones y procesos neurodegenerativos descritos en pacientes de Alzheimer, por lo que es de un gran valor para avanzar en el conocimiento de los procesos patogénicos implicados en esta enfermedad, identificar dianas terapéuticas y evaluar posibles tratamientos que frenen o retrasen el curso de la enfermedad.

La mayoría de la información a nivel molecular y/o celular sobre la evolución de la patología de la EA, ha sido obtenida principalmente en modelos transgénicos de la enfermedad. Por tanto, el objetivo principal de este trabajo de Tesis Doctoral es realizar un estudio histopatológico del hipocampo y el giro parahipocampal de muestras postmortem de pacientes en varios estadios de la enfermedad (Braak II a Braak VI) para, por una parte, avanzar en el conocimiento de los mecanismos

implicados en el desarrollo de la patología y, en segundo lugar, comparar los datos con los obtenidos en modelos transgénicos con el fin de contribuir en la selección y/o mejora de los modelos de la patología. Además, se propone seguir con el estudio y caracterización de modelos transgénicos para desde una perspectiva traslacional identificar posibles dianas de interés terapéutico que puedan ser utilizadas en el desarrollo de nuevas estrategias protectoras.

Para este estudio proponemos los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1. Realizar una caracterización histopatológica preliminar de la progresión de la patología neurofibrilar, producida como consecuencia de la hiperfosforilación de la proteína tau (ovillos neurofibrilares o NFTs, filamentos del neuropilo o NTs, y neuritas distróficas,) y de la patología amiloide en el hipocampo y giro parahipocampal de pacientes en estadio leve (Braak II), estadio moderado o posible Alzheimer prodrómico (Braak III-IV) y dementes (Braak V-VI).

Se estudiará la expresión de fosfo-tau en diferentes estadios de fosforilación y agregación a nivel de soma (pre-NFTs, típicos NFTs intracelulares y NFTs extracelulares o *ghost tangles*) y a nivel dendrítico/axonal (NTs y neuritas distróficas). En este objetivo se utilizarán técnicas inmunohistoquímicas, empleando los anticuerpos específicos AT8 (fosfo Ser199-202, Thr205) en los diferentes estadios Braak, y AT100 (fosfo Ser199-202, Thr205, Thr212, Ser214) en pacientes dementes.

Para la patología amiloide se analizará 1) la expresión extracelular de las diferentes formas de β -amiloide ($A\beta$ 1-42, $A\beta$ prefibrilar y $A\beta$ fibrilar) así como los principales tipos de placas a los que dan lugar (fibrilares, de núcleo denso con halo no fibrilar, y difusas) en el giro dentado, hipocampo propio (CA3, CA2, CA1) y giro parahipocampal (PrS, PaS, CE y CP/CPH); 2) la degeneración neurítica asociada al $A\beta$ y su posible relación espacial con específicos tipos de placas; y 3) la angiopatía cerebral amiloide (CAA) asociada a la progresión de la enfermedad. Se aplicarán tinciones histológicas, técnicas inmunohistoquímicas específicas, para microscopía óptica convencional y fluorescencia confocal, y análisis de imagen para los estudios cuantitativos.

Adicionalmente, se emplearán muestras de ratones APP/ PS1 de 4, 6 y 12 meses de edad con el fin de comparar los resultados obtenidos en las muestras de pacientes de Alzheimer con los datos observados en el modelo animal.

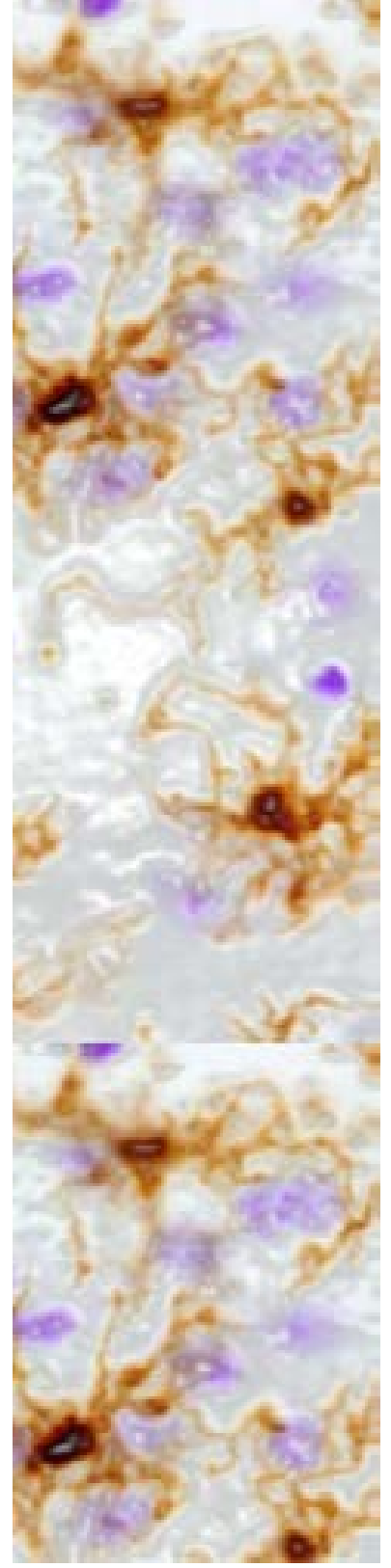
Objetivo 2. Caracterizar la respuesta inflamatoria en el hipocampo y giro parahipocampal de pacientes durante la progresión de la patología desde estadios Braak II a Braak V-VI. Para ello, se determinará 1) el patrón regional de progresión fenotípico (quiescente, activado o senescente) de las células microgliales en relación a las placas seniles; y 2) la respuesta astrogliar que acompaña a la patología amiloide y neurofibrilar. Para ello, se emplearán técnicas inmunohistoquímicas para marcadores específicos de fenotipo para ambas poblaciones gliales, estudios de microscopía láser confocal así como análisis morfométricos y esterológicos.

Al igual que el objetivo 1, se emplearán muestras de ratones APP/PS1 de 4, 6 y 12 meses de edad con el fin de comparar los resultados obtenidos en pacientes de Alzheimer con los datos observados en este modelo animal.

Objetivo 3. Determinar la vulnerabilidad de diferentes poblaciones neuronales del hipocampo y giro parahipocampal de pacientes Braak II, Braak III-IV y Braak V-VI. Se analizarán las principales poblaciones de interneuronas GABAérgicas (SOM y PV) en el giro dentado, CA1 y corteza perirrinal. El grupo de investigación ha caracterizado con anterioridad a estas poblaciones neuronales en el hipocampo y corteza entorrinal del modelo transgénico APP/PS1. Sin embargo, la corteza perirrinal no ha sido objeto de estudio previo, por ello se plantea en este objetivo incluir el análisis de esta región cerebral con objeto de comparar los resultados con los obtenidos en los pacientes y así validar el valor predictivo de este modelo animal. En este objetivo serán necesarias técnicas estereológicas de recuento celular así como inmunotinciones específicas.

Objetivo 4. Analizar el efecto de la inhalación del humo de tabaco sobre las principales alteraciones neuropatológicas que presenta un modelo transgénico APP/PS1. Este objetivo pretende estudiar el impacto de un factor ambiental modificable de gran repercusión en la sociedad humana, como es el caso del tabaco, sobre la progresión de la patología en un modelo animal transgénico para la enfermedad de Alzheimer. Para ello, se estudiarán los principales aspectos patológicos analizados en los objetivos anteriores, como la carga amiloide, la respuesta inflamatoria, la fosforilación de tau y la neurodegeneración, en el hipocampo y la corteza de ratones expuestos a diferentes dosis de humo de tabaco. Se emplearán técnicas histológicas, inmunológicas, estereológicas y análisis morfométricos cuantitativos. Este objetivo específico se llevó a cabo en colaboración con el laboratorio del Dr. Soto y la Dra. Moreno-González (EEUU) y será presentado en forma de publicación científica.

2. Materiales y métodos



2.1. SUJETOS DE ESTUDIO

2.1.1. Muestras humanas post mortem

Las muestras *post mortem* de cerebro humano (hipocampo y giro parahipocampal) fueron obtenidas de los Biobancos de Barcelona (Instituto de Neuropatología, Servicio de Anatomía Patológica, perteneciente al IDIBELL-Hospital Universitario de Bellvitge dirigido por el Dr. Isidro Ferrer) y de Madrid (Banco de Tejidos BT-CIEN, perteneciente a la Fundación CIEN del Instituto de Salud Carlos III, y dirigido por el Dr. Alberto Rábano), siguiendo las normas generales de la legislación española y del comité ético local. Tras la autopsia de los pacientes, el tejido se procesó y se examinó para su clasificación de acuerdo a la patología de tau según los estadios de *Braak* (Braak y Braak, 1991), una vez identificados los signos y cambios neuropatológicos asociados a la enfermedad de Alzheimer. Los cerebros controles procedieron de individuos sin ninguna enfermedad psiquiátrica/neurológica conocida y no se observaron lesiones ni síntomas neurológicos tras realizar el examen neuropatológico. La edad, el sexo, el intervalo de tiempo *post mortem* y el estadio de *Braak* de cada uno de los casos empleados en el presente estudio quedan reflejados en la tabla 2.1. Además, se incluyen los datos referentes a la existencia o no de síntomas clínicos de demencia (única característica clínica disponible) y la causa de fallecimiento en aquellos casos en los que se disponía dicho dato.

Tabla 2.1. Relación de los casos humanos analizados en el presente estudio (sujetos control y sujetos con neuropatología asociada a la enfermedad de Alzheimer) y los datos asociados de edad, sexo, tiempo *post mortem*, clasificación de Braak, síntomas clínicos de demencia y causa de la muerte. TPM, intervalo de tiempo post mortem; Braak, clasificación en los estadios de Braak (0-VI), según la distribución topográfica de ovillos neurofibrilares; M, mujer; H, hombre; EPOC, enfermedad pulmonar obstructiva crónica; *: tejido procedente del Biobanco de Barcelona (I. Ferrer); **: tejido procedente del Biobanco de Madrid (A. Rábano).

Sujeto	Código	Edad	Sexo	TPM	Braak	Demencia	Causa de la muerte
Control 1 *	A06 191	46	M	14 h 5 min	0	No	Parada cardiorespiratoria. Shock cardiogénico.
Control 2 *	A12 52	58	H	3 h 10 min	0	No	-
Control 3 *	A12 79	72	M	6 h 10 min	0	No	-
Control 4 *	A12 35	35	H	3h 15 min	0	No	
Caso 1 *	A07 07	79	H	4 h 15 min	II	No	Insuficiencia respiratoria y cardíaca. EPOC.
Caso 2 *	A08 05	86	M	4 h 15 min	II	No	Asistolia. Infarto agudo de miocardio anterior extenso.
Caso 3 *	A08 30	77	H	2 h 55 min	II	No	Insuficiencia cardíaca y respiratoria.
Caso 4 *	A08 114	83	M	3 h 25 min	II	No	-
Caso 5 *	A06 172	77	M	11 h	II	No	Proceso linfoproliferativo. Insuficiencia respiratoria.

Sujeto	Código	Edad	Sexo	TPM	Braak	Demencia	Causa de la muerte
Caso 6*	A08 142	77	M	9 h 40 min	II	No	Progresión neoplasia.
Caso 7*	A10 64	86	M	5 h 35 min	II	No	Insuficiencia respiratoria. Derrame pleural.
Caso 8*	A10 80	82	M	3 h 05 min	III	No	-
Caso 9*	A09 136	68	M	4 h 45 min	III	No	-
Caso 10*	A10 47	81	H	5 h 5 min	III	No	Síndrome mieloproliferativo
Caso 11*	A10 59	77	M	10 h 15 min	III	No	Parada cardiorespiratoria. Encefalopatía amiloide.
Caso 12**	BC 1622	74	M	-	III	-	-
Caso 13**	BC 1657	81	H	-	IV	-	-
Caso 14**	BC 1593	90	H	-	IV	-	-
Caso 15*	A12 23	67	H	16 h 15 min	IV	No	Parada cardiorespiratoria. Disección aórtica.
Caso 16*	A12 42	82	M	17 h 15 min	IV	No	-
Caso 17*	A12 48	84	H	12 h 15 min	IV	No	-
Caso 18*	A11 38	56	M	7 h	V-VI	Sí	-
Caso 19*	A09 151	63	M	13 h 30 min	V-VI	Sí	Neoplasia pulmonar.
Caso 20*	A10 79	86	M	20 h 35 min	V-VI	Sí	Parada cardiorespiratoria. Tromboembolismo pulmonar.
Caso 21*	A10 92	67	M	8 h	V-VI	Sí	Parada cardiorespiratoria. Embolia cardiogénica.
Caso 22*	BK 1060	87	M	5 h 15 min	V-VI	Sí	-
Caso 23*	BK 430	77	M	16 h 30 min	V-VI	Sí	-
Caso 24*	BK 504	84	M	9 h	V-VI	Sí	-
Caso 25*	BK 673	75	M	7 h 45 min	V-VI	Sí	-
Caso 26*	BK 763	76	H	6 h	V-VI	Sí	-
Caso 27*	BK 765	93	H	5 h	V-VI	Sí	-
Caso 28*	BK 785	82	H	5 h	V-VI	Sí	-
Caso 29*	BK 873	85	H	4 h 30 min	V-VI	Sí	-
Caso 30**	BC 1650	81	H	-	V-VI	-	-
Caso 31**	BC 1638	68	M	-	V-VI	-	-
Caso 32**	BC 1676	84	H	-	V-VI	-	-
Caso 33**	BC 1673	81	H	-	V-VI	-	-

2.1.2. Animales de experimentación

Los animales de experimentación empleados en el presente trabajo fueron ratones macho, de entre 4 y 18 meses de edad, de las siguientes líneas transgénicas:

- Ratones doble transgénicos APP/PS1 con fondo genético C57BL/6 obtenidos por cruce de ratones transgénicos homocigotos PS1_{M146L} (sobrexpresan la forma humana mutada PS1_{M146L} del Alzheimer familiar bajo el control del promotor HMG-CoA reductasa) con ratones heterocigotos de la línea transgénica APP_{751SL} (caracterizada por las mutaciones del Alzheimer familiar *swedish* [KM670/671NL] y *london* [V717I] en el gen de la proteína precursora amiloide humana, hAPP, bajo el control del promotor Thy1).

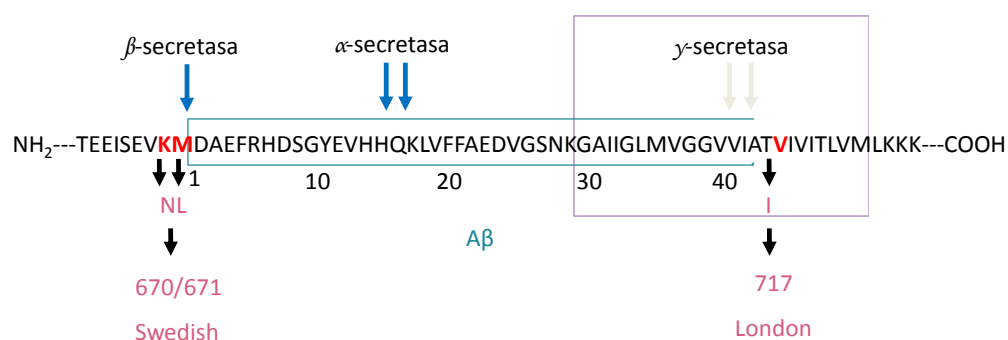


Figura 2.1. Esquema de las mutaciones que contiene la secuencia aminoacídica de la proteína APP751 humana en los ratones transgénicos PS1/APP. La proteína hAPP de nuestro modelo transgénico presenta las mutaciones *Swedish* (que afecta a los aminoácidos 670 y 671) y *London* (en el aminoácido 717). La secuencia sombreada en turquesa representa los aminoácidos que forman el péptido β -amiloide ($A\beta$) tras el procesamiento del APP. La zona violeta es la región transmembrana, y las flechas indican las zonas de corte de las enzimas implicadas en el procesamiento.

La generación y caracterización inicial de estos ratones transgénicos APP_{751SL}/PS1_{M146L} ha sido previamente descrita (Blanchard et al. 2003; Ramos et al. 2006; Caballero et al. 2007; Jimenez et al. 2008, 2011; Moreno-Gonzalez et al. 2009; Sanchez-Varo et al. 2012; Torres et al. 2012; Trujillo-Estrada et al. 2013, 2014). Las colonias de los parentales PS1_{M146L} y APP_{751SL} fueron suministradas por la industria farmacéutica SANOFI (París, Francia) a través de *Charles-River Laboratories* (Francia). Los animales se mantuvieron estabulados en 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 ratones tuvieron libre acceso al agua y a una alimentación estándar.

- Ratones doble transgénicos PS1_{dE9}/APP_s (B6C3-Tg (APP^{swe}, PSEN1^{dE9}) 85Dbo/J) de origen comercial (Jackson Laboratory; Bar Harbor, Maine). Estos ratones dobles transgénicos expresan una proteína precursora de amiloide quimérica humana/ratón que contiene la mutación *Swedish* (Mo/HuAPP695swe) y el gen *PS1* que presenta una delección del exón 9

(PS1_{de9}). Estos ratones fueron utilizados para el Objetivo 4, que fue realizado durante una estancia en el laboratorio de la Dra. Inés Moreno-González y el Dr. Claudio Soto en Houston (EEUU). Los animales fueron mantenidos en el estabulario de la School of Medicine (Houston, EEUU) y alojados en grupos de hasta 5 en jaulas ventiladas individualmente en condiciones estándar (22 °C, 12 h luz-oscuridad ciclo) recibiendo alimentos y agua *ad libitum*. Todos los experimentos con estos animales se llevaron a cabo de acuerdo con las normas del National Institute of Health (NIH).

- Además, como controles se han utilizado ratones no transgénicos (*wildtype*, WT) del mismo fondo genético y edad.

Todos los experimentos se llevaron a cabo en la Universidad de Málaga de acuerdo con el Real Decreto 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 8/02/2013) 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 empleados, así como el estrés y sufrimiento de éstos durante la manipulación y experimentación, fueron reducidos al máximo.

2.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS Y DELIMITACIÓN DE LAS ÁREAS CEREBRALES

2.2.1. Procesamiento de los cerebros de ratón

Para la fijación del cerebro por perfusión vascular, los ratones se anestesiaron previamente mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (Dolethal®, Vetequinol; 60 mg/Kg) y posteriormente se perfundieron transcárdialmente con ayuda de una bomba de perfusión (Dinko, D25V). Primero, se lavó todo el sistema vascular con tampón fosfato salino (PBS) a 0,1 M y pH 7,4 (ver apéndice 2.8.1.) durante un minuto. Una vez drenada toda la sangre, se perfundió durante 30 min con 180 mL de solución fijadora, compuesta por paraformaldehído (1.04005, Merck) al 4%, lisina 75 mM (1.05700, Merck) y metaperyodato sódico 10 mM (1.06597, Merck) en tampón fosfato (PB) a 0,1 M y pH 7,4 (ver apéndice 2.8.1. y 2.8.2.). A continuación, se extrajeron los cerebros y se postfijaron por inmersión, en la misma solución fijadora, durante una noche a 4°C.

Tras la postfijación, los cerebros se lavaron 3 veces durante 10 minutos con tampón PBS y se sumergieron en una solución crioprotectora de sacarosa (131621, Panreac) al 30% (ver apéndice 2.8.3.) hasta que se hundieron por completo en dicha solución. Finalmente, los cerebros se congelaron con nieve carbónica y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior procesamiento.

Los cerebros se cortaron rostro-caudalmente en secciones coronales de 40 μm de grosor con ayuda de un micrótopo de congelación (Leica, CM-1325). Dichas secciones se almacenaron en *free-floating* de manera seriada en placas multipocillo (7 series por placa) que contenían PBS y 0,02% de azida sódica (122712.1608, Panreac). De esta manera, dos cortes consecutivos pertenecientes a una misma serie distan entre sí 280 μm y cada pocillo contiene una representación rostrocaudal de 1/7 del total del cerebro. Las placas con el tejido se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

2.2.2. Delimitación y situación de las regiones cerebrales de ratón

La delimitación de la corteza perirrinal se realizó en relación a las estructuras corticales adyacentes a ésta, contrastando siempre con el atlas de ratón (Paxinos y Franklin 2013)(Fig. 2.2 A1-A3). La corteza perirrinal forma parte de la región parahipocampal dentro del lóbulo temporal medial. En secciones coronales, la corteza perirrinal se sitúa entre -1,34 mm y -4,60 mm según las coordenadas de Bregma. Las áreas 35 y 36 se pueden delimitar también por los cambios en la intensidad de neuropilo marcado al emplear anticuerpos contra calretinina (Fig. 2.2 B2) o parvalbúmina (Fig. 2.2 B3). Además, el anticuerpo 6E10 contra β -amiloide muestra un patrón de expresión diferencial en ambas regiones, de modo que en el área 35, se marcan fuertemente las capas II-III y por el contrario, en el área 36, la capa V es la más inmunorreactiva en comparación con las capas II-IV, que se tiñen débilmente (Fig. 2.2 B1).

En cuanto al hipocampo (Fig. 2.2 A1-A3 y C), en secciones coronales se sitúa entre las coordenadas de Bregma -0,94 mm hasta -3,88 mm. Aparece dorsalmente tras los niveles de los núcleos septales, delimitado inferiormente por el tálamo dorsal, superiormente por el cuerpo calloso y dorsolateralmente por el córtex parietal. Posteriormente se curva y se extiende ventralmente hacia el área amigdaloides, con las cortezas perirrinal y entorrinal, entre otras, definiendo sus límites laterales a estos niveles.

2.2.3. Procesamiento de las muestras humanas

Tras la extracción del cerebro en la autopsia, el personal del Biobanco correspondiente procedió a la disección de las distintas regiones cerebrales. Un hemisferio cerebral fue fijado por inmersión en paraformaldehído al 4% en PB 0,1M pH 7,4 y tras 2 horas, se cortó en pequeños bloques que se post-fijaron durante 24-48 h a 4 °C. Después, parte de las muestras fue procesada para inclusión en parafina y otras se crioprotegieron en soluciones de sacarosa crecientes y se almacenaron a -80 °C. El otro hemisferio cerebral fue congelado, sin fijar, para posteriores estudios bioquímicos/moleculares.

Una vez recibidas las muestras en nuestro laboratorio, el tejido fijado y crioprotegido se cortó en secciones coronales de 30 μm de grosor en un microtopo de congelación (Leica, CM-1325), las secciones se almacenaron en *free-floating* de manera seriada en placas multipocillo (6 series por placa) con PBS 0,1M pH 7,4 y 0,02% de azida sódica, y se conservó a 4 °C hasta su uso. Las muestras incluidas en parafina fueron cortadas en un microtopo de deslizamiento (Leica RM2235) en

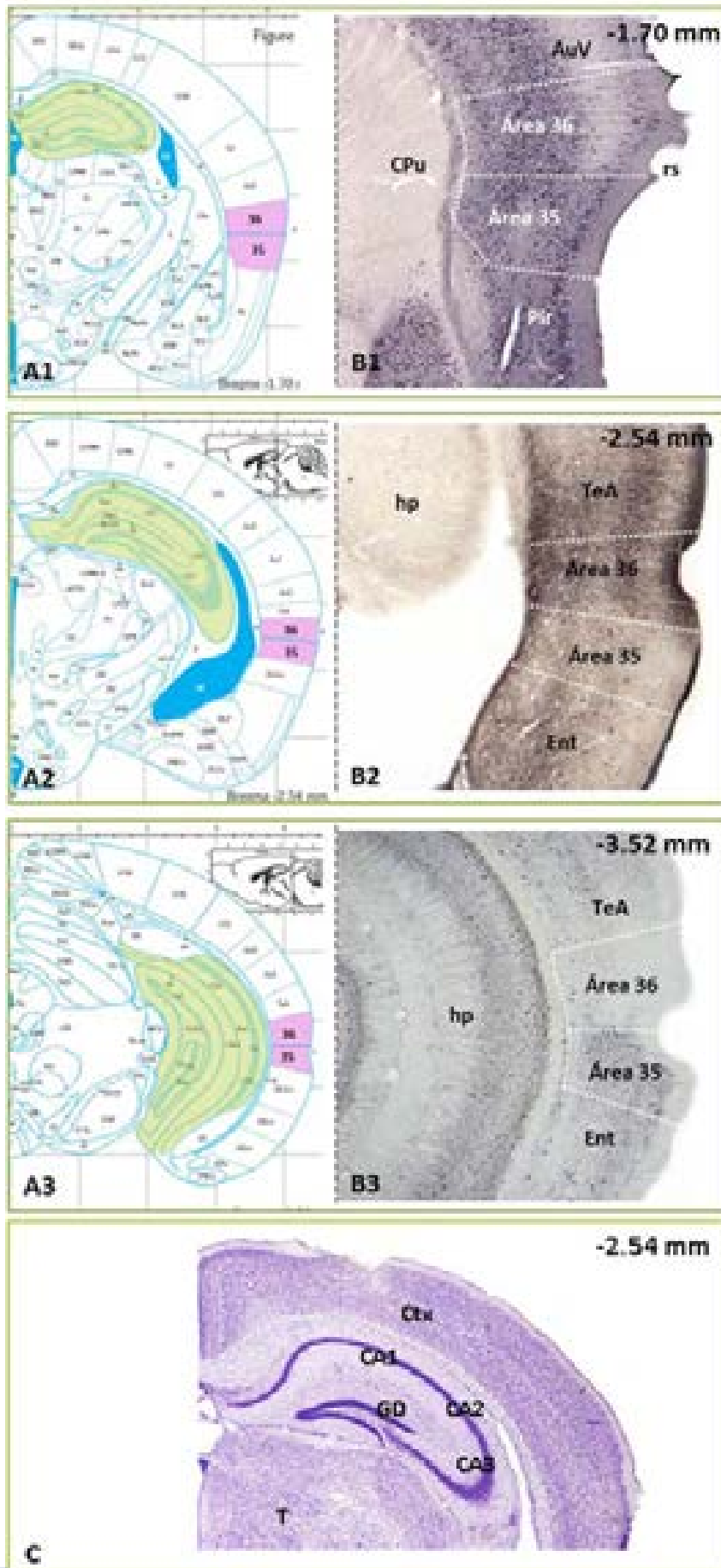


Figura 2.2. Delimitación de la corteza perirrinal y del hipocampo en los ratones empleados en el presente estudio. Se establecieron las coordenadas estereotáxicas de las secciones coronales, comparando un atlas de cerebro de ratón (A1-A3), con el inmunomarcaje obtenido con los anticuerpos para β -amiloide (B1), Calretinina (B2) y Parvalbúmina (B3). Se muestra una representación rostrocaudal del hipocampo, resaltado en verde en tres niveles distintos (A1-A3). (C) Sección coronal con hipocampo teñido con violeta de cresilo. Distancia de Bregma según Franklin y Paxinos, 2008). AuV, corteza auditiva secundaria ventral; Cpu, estriado; Ent, corteza entorrinal; hp, hipocampo; rs, sulco rinal; TeA, corteza asociativa temporal. CA: Cuerno de Amón; Ctx: córtex; GD: Giro dentado; T: tálamo.

secciones coronales de 10 μm de grosor y colocadas seriadamente sobre portaobjetos gelatinados. Los sujetos control y aquellos con patología tipo Alzheimer se procesaron de la misma manera y en paralelo para los estudios inmunohistoquímicos.

2.2.4. Delimitación y situación de las regiones cerebrales de las muestras humanas

La delimitación del hipocampo y de la región parahipocampal se realizó en relación a las estructuras corticales adyacentes a éstas siguiendo el atlas de cerebro humano de Mai y colaboradores (*Atlas of the Human Brain, 2008*) (Fig. 2.3 A1-A3), el atlas de cerebro Allen (*Allen Brain Atlas*, disponible en la web www.brain-map.org), y también por los cambios en la intensidad de neuropilo marcado al emplear anticuerpos contra parvalbúmina (Fig. 2.3 B1-B3) o tau fosforilado.

La formación hipocampal está comprendida por el hipocampo propio (CA1, CA2, CA3 y GD) y el subículo (S) y en secciones coronales se sitúa entre las coordenadas estereotáxicas 6,7 mm y 44,9 mm. La región parahipocampal integra al presubículo (PrS), parasubículo (PaS), corteza entorrinal (CE), corteza perirrinal (CP) y corteza parahipocampal (CPH) y se sitúa entre las coordenadas estereotáxicas -10 mm y 50,3 mm. Ambas regiones forman parte del lóbulo temporal medial. Debido a la limitación en el grosor del tejido empleado en el presente estudio así como a las diferencias en el nivel a lo largo del eje rostro-caudal, solo pudieron ser examinadas las áreas comprendidas entre las coordenadas 17 mm y 35 mm. Regiones como la corteza entorrinal, de gran importancia neuropatológica para la enfermedad, no pudieron ser analizadas a nivel cuantitativo por su pobre representación en las muestras cedidas. Los estudios cuantitativos de la región cortical no hipocampal se llevaron a cabo en la corteza perirrinal y corteza parahipocampal dentro del giro parahipocampal.

2.3. TINCIONES HISTOLÓGICAS

2.3.1. Violeta de Cresilo

El violeta de cresilo ($\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3$) es un colorante básico que tiñe de color azul-violeta moléculas de naturaleza ácida como los ácidos nucleicos, presentes en el núcleo celular, así como acúmulos de retículo endoplasmático rugoso y polirribosomas conocidos como grumos de Nissl.

Para proceder a la tinción con este colorante, las secciones incluidas en parafina fueron primero desparafinadas en xileno e hidratadas, mientras que las almacenadas *free floating* se montaron sobre los portaobjetos gelatinizados (ver apéndice 2.8.4.), que una vez secos, se dejaron en una estufa a 37 °C durante toda una noche. Al día siguiente, se hidrató el tejido introduciéndolos 20 minutos en agua destilada seguido de otros 20 minutos en tampón PBS 0,1 M pH 7,4. A continuación, se sumergieron los cortes en el colorante violeta de cresilo (1.15940, Merck) preparado al 1% en agua destilada, previamente filtrado, y con unas gotas de ácido acético glacial

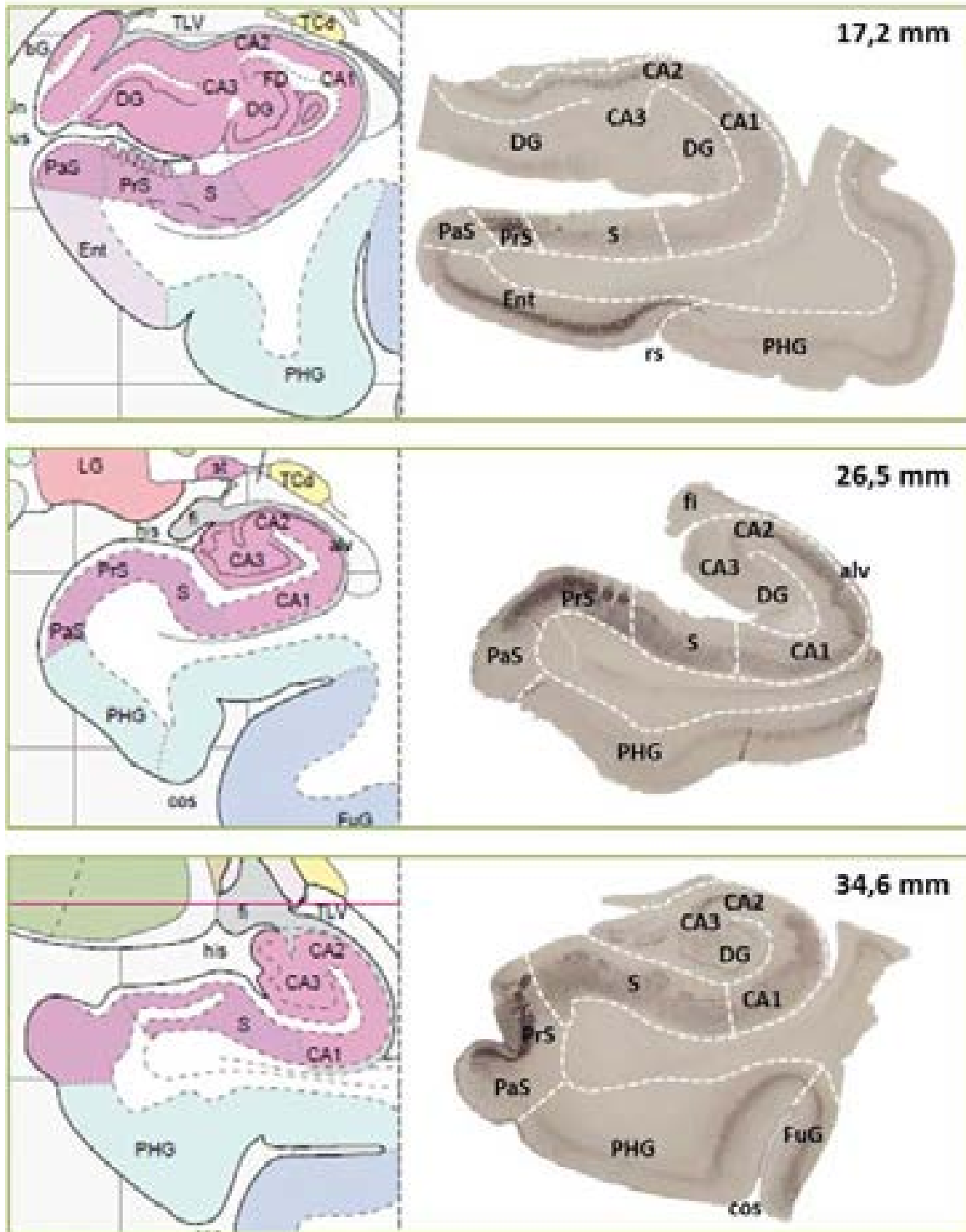


Figura 2.3. Delimitación y situación del lóbulo temporal medial que contiene la formación hipocámpal y la región parahipocámpal de las muestras humanas empleadas en este estudio. Las coordenadas estereotáxicas de los cortes coronales fueron establecidas a lo largo del eje rostro-caudal según el atlas de cerebro humano (A1-A3) y por las diferencias en la intensidad de neuropilo marcado con anti-PV, que ayudaron a establecer los límites entre las regiones adyacentes (B1-B3). Las muestras cedidas se situaron entre los niveles 17 mm y 35 mm, por lo que solo las secciones más rostrales (A1, B1) contenían corteza entorrinal. *alv*, alveo; *CA*, cuerno de Amón; *cos*, sulco colateral; *DG*, giro dentado; *Ent*, corteza entorrinal; *fi*, fimbria; *FuG*, giro fusiforme; *PaS*, parasubiculo; *PrS*, presubiculo; *PHG*, giro parahipocámpal; *rs*, sulco rinal. *S*, subículo.

(141008.1611, Panreac) como mordiente, durante 7 minutos. Posteriormente, las secciones se deshidrataron en etanol de 70° durante 2 minutos, etanol de 96° (más unas gotas de ácido acético glacial), durante 2 minutos, etanol de 100° durante 5 minutos y, finalmente, se aclararon con xileno (141769.2711, Panreac) durante 10 minutos. Para el montaje de los cubreobjetos se usó un medio de montaje miscible en xileno, como el DPX (360294H, BHD).

2.3. 2. Tioflavina S

La Tioflavina S (TioS) es una fluoresceína verde que se une de forma específica a los agregados fibrilares de β -amiloide que poseen una conformación de lámina β plegada, y también a los ovillos neurofibrilares. Esta tinción se observa a microscopía de fluorescencia. La tinción con TioS se llevó a cabo lavando durante 10 minutos (tres veces) con PBS 0,1 M pH 7,4 para posteriormente incubar los cortes durante 5 minutos en la solución de TioS (T1892; Sigma-Adrich) al 0,025% en etanol al 50%, en oscuridad y agitación constante. Tras esta incubación, las secciones se lavaron dos veces en etanol al 50% durante 5 minutos y dos veces en agua destilada durante también 5 minutos. Posteriormente, las muestras se montaron en portaobjetos gelatinizados y se colocó el cubreobjetos usando un medio de montaje específico para mantener la fluorescencia de las muestras (PBS 0,1M y glicerina a una proporción 1:1, más el 3% de 1,4-diazabicyclo [2.2.2]-octano o DABCO (D-2522, Sigma-Aldrich) (ver apéndice 2.8.7.). Finalmente, las secciones se conservaron a 4 °C y en oscuridad hasta su estudio.

2.4. TINCIONES INMUNOHISTOQUÍMICAS PARA MICROSCOPIA ÓPTICA

2.4.1. Procedimiento general para microscopía óptica de campo claro

En primer lugar, las secciones incluidas en parafina fueron desparafinadas en xileno e hidratadas mientras que las almacenadas *free floating*, con el fin de eliminar los restos de sales de azida sódica del tejido, se lavaron con tampón PBS 0,1 M pH 7,4 (10 minutos 3 veces). A continuación, para aumentar o mejorar la señal inmunohistoquímica, se llevó a cabo un pretratamiento de los cortes con calor, introduciendo el tejido en tampón citrato sódico (131655, Panreac) a 50 mM y pH6 (ver apéndice 2.8.1.) a 80 °C en un baño termostático (Unitronic, 320 OR; Selecta) durante 30 minutos, pasados los cuales, se dejaron enfriar las secciones en el mismo tampón unos 10 minutos y se lavaron de nuevo en tampón PBS durante 10 minutos. Para la inactivación de la peroxidasa endógena se incubó el tejido en una solución con peróxido de hidrógeno (1.07210, Merck) al 3% y metanol (141091.1211, Panreac) al 10% en PBS durante 20 minutos. Tras tres nuevos lavados se bloquearon la avidina y la biotina endógenas, así como las proteínas unidas a biotina, empleando el kit de bloqueo avidina-biotina (SP-2001, Vector Labs) durante 15 minutos en cada una de las dos soluciones, con un lavado de 10 minutos entre ambas incubaciones. A continuación, para evitar reacciones inespecíficas, se bloquearon las secciones con suero normal de cabra (G9023, Sigma

Aldrich) o de caballo (H0146, Sigma-Adrich) (cuando el anticuerpo primario estaba producido en cabra) al 5% en PBS durante 1 hora y, seguidamente los cortes se incubaron en el correspondiente anticuerpo primario entre 24 y 72 horas y a una concentración y temperatura determinada para cada uno de los diferentes anticuerpos (ver marcadores utilizados, anticuerpos primarios y condiciones de incubación en las tablas 2.2 y 2.3), todos ellos diluidos en tampón PBS 0,1 M pH 7,4 con azida sódica al 0,1% y Tritón X-100 (T9284, Sigma Aldrich) al 0,2%.

Tabla 2.2. Marcadores analizados en los estudios inmunohistoquímicos y sus características.

APP	Proteína precursora amiloide. Tras su procesamiento se genera el péptido β -amiloide. El anticuerpo empleado reconoce el extremo C-terminal desde el aminoácido 676 al 695.
β-amiloide	Fragmento peptídico de entre 39 y 43 aminoácidos generado tras el procesamiento del APP. El anticuerpo 4G8 reconoce los aminoácidos situados entre las posiciones 17-24 y se empleó para el marcaje del A β total, aunque también puede reconocer formas precursoras. El anticuerpo 6E10 reconoce los primeros 17 residuos aminoacídicos del péptido A β , y por tanto también reconoce formas precursoras.
β-amiloide 1-42	Péptido amiloide de 42 aminoácidos con gran capacidad de agregación. Principal componente de las placas extracelulares.
β-amiloide oligomérico	Formas oligoméricas del β -amiloide de pequeño tamaño. Son las especies a las que se les atribuyen las propiedades más tóxicas. El anticuerpo OC reconoce la conformación que adquieren las fibras de oligómeros.
ALDH1L1	Del inglés <i>aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1</i> . Proteína de la familia de las aldehído deshidrogenasas. Marcador específico de astrogliá.
CD3	Complejo proteico que actúa como receptor de membrana en los linfocitos T.
CD45	Receptor de membrana plasmática expresado por linfocitos, macrófagos y microglía, implicado en la activación de las células T. Marcador de macrófagos infiltrados y microglía.
CD68	Proteína perteneciente a la familia de las glucoproteínas de membrana asociadas a lisosomas/endosomas (LAMP) y también a la familia de los receptores <i>scavenger</i> de los macrófagos (MSR). Se encuentra en los lisosomas, endosomas y superficie celular interviniendo en la fagocitosis y en la activación de macrófagos. Marcador de microglía y macrófagos activados M1.
CX3CR1	Receptor de la proteína fractalquina, proteína transmembrana y quimiocina implicada en la adhesión y migración de macrófagos y células microgliales. Marcador de microglía.
Ferritina	Proteína implicada en el almacenamiento del hierro intracelular compuesta por 24 subunidades de cadenas pesadas (H) y ligeras (L), presente en todos los tipos celulares. La microglía senescente expresa gran cantidad de L-ferritina.
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida que forma los filamentos intermedios de células astrogliales. Marcador específico de astrocitos.
Iba 1	Del inglés <i>ionized calcium binding adapter molecule</i> . Molécula del citoesqueleto de membrana implicada en los cambios morfológicos que se producen en la microglía y en los macrófagos. Marcador de microglía y macrófagos.
MRC-1	Receptor de manosa 1. Lectina de tipo C presente en la superficie de macrófagos y microglía que interviene en procesos de endocitosis. Marcador M2.

NeuN	Proteína nuclear presente en las neuronas. Marcador específico neuronal.
nNOS	Sintasa de óxido nítrico neuronal que está presente en una subpoblación de interneuronas GABAérgicas que colocaliza con SOM.
P2ry12	Receptor purinérgico expresado por las células microgliales. Marcador específico de microglía.
PV	Parvalbúmina. Proteína ligadora de calcio presente en una subpoblación de interneuronas GABAérgicas que realizan una fuerte inhibición de las neuronas principales.
SOM	Somatostatina. Neuropeptido presente en una subpoblación de interneuronas GABAérgicas que se encuentra gravemente afectada por la EA.
Tau fosforilada	Proteína asociada a microtúbulos (MAP) que interviene en la estabilización de éstos. En la EA se encuentra hiperfosforilada, lo que provoca la desestabilización del citoesqueleto y la consiguiente formación de los ovillos neurofibrilares. El anticuerpo AT8 reconoce la secuencia de fosforilación Ser199, Ser202 y Thr205; el anticuerpo AT100 reconoce la secuencia de epítopes fosforilados en Ser199, Ser202, Thr205, Thr212 y Ser214.
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa. Es una citoquina pro-inflamatoria producida por células gliales y por neuronas, que promueve la activación de la microglía y la producción de sustancias citotóxicas proinflamatorias. Marcador de microglía activada M1.

Tabla 2.3. Relación de anticuerpos primarios empleados en los estudios inmunohistoquímicos de microscopía óptica. *Los anticuerpos primarios producidos en ratón son monoclonales; el resto de anticuerpos son policlonales.

Anticuerpo primario	Dilución de uso	Incubación (tiempo y temperatura)	Animal de obtención	Casa comercial; Referencia
Anti-APP-C	1:20000	24h; 22 °C	Conejo	Sigma-Aldrich; A 8717
Anti-Aβ 17-24 (4G8)	1:2000	48h; 22 °C	Ratón*	Covance; SIG 39220
Anti-Aβ 42	1:1000	48h; 22 °C	Conejo	Merck-Millipore; AB5078P
Anti-Aβ oligomérico (OC)	1:5000	24h; 22 °C	Conejo	Merck-Millipore; AB2286
Anti-PHF-Tau (AT8)	1:500	48h; 22 °C	Ratón*	Pierce Biotech; MN 1020
Anti-PHF-Tau (AT100)	1:500	48h; 22 °C	Ratón*	Autogen Bioclear; 90209
Anti-ALDH1L1	1:2000	48h; 22 °C	Ratón*	Merck-Millipore; MABN495
Anti-CD45	1:1000	48h; 22 °C	Conejo	Abcam; ab10558
Anti-CD68 (PG-M1)	1:1000	48h; 22 °C	Ratón*	Dako; M0876
Anti-CD3	1:100	48h; 22 °C	Hamster	BD; 550277
Anti-Ferritina	1:500	48h; 22 °C	Conejo	Sigma-Aldrich, F6136
Anti-GFAP	1:2000	24h; 22 °C	Pollo	Chemicon; AB5541
Anti-GFAP	1:10000	24h; 22 °C	Conejo	Dako; Z0334
Anti-Iba1	1:1000	24h; 22 °C	Conejo	Wako Chemicals; 019-19741

Anticuerpo primario	Dilución de uso	Incubación (tiempo y temperatura)	Animal de obtención	Casa comercial; Referencia
Anti-Iba1	1:2000	24h; 22 °C	Cabra	Abcam; ab5076
Anti-MRC1	1:1000	48h; 22 °C	Conejo	Sigma-Aldrich; HPA004114
Anti-NeuN	1:1000	48h; 22 °C	Ratón	Merck-Millipore; MAB377
Anti-nNOS	1:1000	48h; 22 °C	Conejo	Sigma-Aldrich; N7280
Anti-P2ry12	1:200	48h; 22 °C	Conejo	Sigma-Aldrich; HPA014518
Anti-PV	1:5000	48h; 22 °C	Conejo	Swant; PV-28
Anti-SOM (D-20)	1:1000	24h; 22 °C	Cabra	Santa Cruz Biotech; sc-7819
Anti-TNFα (M-18)	1:500	48h; 22 °C	Cabra	Santa Cruz Biotech; sc-1348

Imunohistoquímica simple para campo claro

Transcurrido el periodo de incubación en el anticuerpo primario, las secciones se lavaron de nuevo con tampón PBS (10 minutos 3 veces) y se incubaron en el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente, a una concentración de 1/500 en el mismo tampón que el anticuerpo primario, durante 75 minutos a temperatura ambiente (ver tabla 2.4). A continuación, tras lavar de nuevo (10 minutos 3 veces) se incubaron los cortes en el complejo estreptavidina-peroxidasa de rábano (Extravidin®; E-2886, Sigma-Aldrich) a una dilución 1/2000 en tampón PBS con Tritón al 0,2 % durante 90 minutos y a temperatura ambiente. Se lavaron las secciones en PBS (10 minutos 3 veces) y, finalmente, el producto de la inmunorreacción se visualizó introduciendo el tejido en una solución de 3-3'-diaminobencidina tetrahidro-clorhídrico (DAB) (D5637, Sigma-Aldrich) al 0,05% en tampón Tris clorhídrico (Trizma®, T1503, Sigma-Aldrich), conteniendo 0,03% de sulfato amónico de níquel (464545, Farmitalia Carlo Erba) para intensificar el producto de la reacción de la peroxidasa (precipitado de color azul) y, 0,03% de peróxido de hidrógeno como sustrato de la enzima (ver apéndice 2.8.5.). El tiempo de revelado varió en función del anticuerpo utilizado a fin de conseguir la intensidad de inmunomarcado deseada, la cual se monitorizó bajo el microscopio.

Todos los pasos de incubación y lavado se llevaron a cabo en agitación constante (agitador de rotación circular Nahita 6845). Además, las secciones de cerebro de los diferentes individuos se procesaron siempre en paralelo, utilizando las mismas soluciones, tampones y condiciones de incubación (excepto las secciones empleadas como control negativo, que no se incubaron en el anticuerpo primario).

Para la conservación y estudio posterior del tejido, las secciones se lavaron con tampón PBS (10 minutos 2 veces) y las secciones en *free floating* se montaron en portaobjetos gelatinados que se secaron en una estufa a 37 °C durante una noche. Posteriormente, las secciones se deshidrataron en etanol de graduación creciente (50 °, 70 °, 96 ° y 100 °) (ver apéndice 2.8.6.) hasta aclarar las secciones con xileno y, finalmente, se colocaron los cubreobjetos empleando DPX.

Tabla 2.4. Anticuerpos secundarios utilizados en los estudios inmunohistoquímicos de microscopía óptica de campo claro.

Anticuerpo secundario	Dilución de uso	Incubación (tiempo y temperatura)	Animal de obtención	Casa comercial; Referencia
Anti-IgG de cabra	1:500	70 min; 22 °C	Caballo	Vector Lab.; BA-9500
Anti-IgG de conejo	1:500	70 min; 22 °C	Cabra	Vector Lab.; BA-1000
Anti-IgG de pollo	1:500	70 min; 22 °C	Cabra	Vector Lab.; BA-9010
Anti-IgG de rata	1:500	70 min; 22 °C	Cabra	Vector Lab.; BA-9400
Anti-IgG de ratón	1:500	70 min; 22 °C	Cabra	Vector Lab.; BA-9200

Inmunohistoquímica doble y triple para campo claro

El inmunomarcaje múltiple empleando dos ó tres anticuerpos primarios consistió en varios procesos de revelado consecutivos en los cuales el producto de la reacción de cada uno de los marcajes inmunohistoquímicos presentó un color diferente (azul, marrón y violeta). Este tipo de inmunotinción fue posible solo cuando los anticuerpos primarios reconocían antígenos de tipos celulares diferentes o estructuras con distinta localización.

Se procedió con el protocolo general, es decir, el tejido se pretrató con calor y posteriormente se bloqueó la peroxidasa endógena así como la avidina y la biotina endógena; a continuación, se incubó en el primero de los anticuerpos primarios, seguido del anticuerpo secundario correspondiente, y la estreptavidina. Finalmente, se reveló la actividad de la enzima empleando los mismos reactivos que se detallan en el apartado anterior, precipitando el producto de la reacción en un color azul (DAB más níquel). Tras el revelado, se lavaron las secciones con PBS (10 minutos 3 veces), se incubaron en suero normal de cabra o de caballo, y de nuevo en el siguiente anticuerpo primario, que fue revelado de la misma manera omitiendo la adición de níquel a la solución de DAB, por lo que el marcaje se visualizó en marrón. En los casos en los que se inmunomarcó con un tercer anticuerpo primario, éste fue visualizado empleando el kit de revelado *VECTOR VIP Peroxidase Substrate Kit (SK-4600, Vector Labs.)* que tintó de color violeta, siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. Por último, los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados, se dejaron secar en la estufa a 37 °C durante una noche y se deshidrataron al día siguiente en soluciones de alcohol de graduación creciente, se aclararon con xileno y se cubrieron con DPX.

2.4.2. Procedimiento general para microscopía convencional de fluorescencia y microscopía láser confocal

Para realizar la técnica de inmunofluorescencia no fue necesario bloquear la peroxidasa endógena, puesto que no se empleó un sistema de revelado acoplado a la dicha enzima. De la misma

manera, cuando se emplearon anticuerpos secundarios acoplados directamente a un fluorocromo, tampoco fue necesario bloquear la biotina endógena. Por ello, tras lavar las secciones con tampón PBS (10 minutos 3 veces), incrementar la antigenicidad del tejido con calor (en el caso en el que fuera necesario) y bloquear con suero normal de cabra o de caballo, se incubaron los cortes en el anticuerpo primario correspondiente a una concentración, tiempo y temperatura determinada para cada uno de los diferentes anticuerpos, todos ellos diluidos en tampón PBS 0,1M con azida sódica al 0,1% y Tritón X-100 al 0,2%. A diferencia de la inmunohistoquímica doble para campo claro, para fluorescencia los anticuerpos primarios se incubaron en días consecutivos, lavando siempre tres veces entre ellos.

Tras lavar de nuevo con PBS (10 minutos 3 veces), la unión del anticuerpo primario a su antígeno fue detectada incubando los cortes secuencialmente con los anticuerpos secundarios correspondientes Alexa Fluor® 568 y Alexa Fluor® 488 (acoplados directamente a un fluorocromo, emitiendo en rojo o en verde, respectivamente)(ver tabla 2.5), ambos diluidos en tampón PBS con 0,2% de Tritón X-100 a una concentración de 1/1000, durante 75 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad. Entre ambas incubaciones se procedió a lavar el tejido con PBS (10 minutos 3 veces).

En las ocasiones en las que se empleó un tercer anticuerpo primario o no fue posible utilizar dos anticuerpos secundarios acoplados directamente a un fluorocromo, se incubó con un anticuerpo secundario biotinilado seguido de una estreptavidina conjugada a un fluorocromo (Alexa Fluor® 405), a una dilución 1/1000 en tampón PBS 0,1 M con 0,2% de Tritón X-100, durante 90 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

Para eliminar la autofluorescencia del tejido humano, debido a la acumulación con la edad de gránulos de lipofucsina autofluorescentes, se sumergieron los cortes, previamente montados sobre portaobjetos gelatinizados, en alcohol de 70° durante 5 minutos y seguidamente, en una solución comercial (*Autofluorescence Eliminator Reagent*; 2160, Merck-Millipore), siguiendo el protocolo predeterminado por el fabricante.

Por último, las secciones se cubrieron usando un medio de montaje específico para mantener la fluorescencia de las muestras (PBS 0,1M y glicerina a una proporción 1:1, más el 3% de 1,4-diazabicio [2.2.2.]-octano o DABCO) (ver apéndice 2.8.7.), y se almacenaron en oscuridad a 4 °C hasta su visualización en un microscopio láser cofocal (Leica SP5).

Tabla 2.5. Relación de anticuerpos secundarios utilizados en los estudios inmunohistoquímicos de microscopía de fluorescencia. Alexa Fluor®488 *¹, la longitud de onda de absorción es de 495 nm y la de emisión de 519 nm (verde); Alexa Fluor®568*², la longitud de onda de absorción es de 578 nm y la de emisión de 603 nm (rojo); Alexa Fluor®405*³, la longitud de onda de absorción es de 402 nm y la de emisión es de 421 nm (UV).

Reactivo	Fluorocromo	Especie de obtención	Dilución	Casa comercial; Referencia
Anti-IgG de conejo	Alexa Fluor® 488* ¹	Burro	1:1000	Molecular Probes; A21206
Anti-IgG de conejo	Alexa Fluor® 488* ¹	Cabra	1:1000	Molecular Probes; A11008
Anti-IgG de ratón	Alexa Fluor® 488* ¹	Burro	1:1000	Molecular Probes; A21202

Anti-IgG de cabra	Alexa Fluor® 488* ¹	Burro	1:1000	Molecular Probes; A11055
Anti-IgG de pollo	Alexa Fluor® 488* ¹	Cabra	1:1000	Molecular Probes; A11039
Anti-IgG de conejo	Alexa Fluor® 568* ²	Burro	1:1000	Molecular Probes; A10042
Anti-IgG de conejo	Alexa Fluor® 568* ²	Cabra	1:1000	Molecular Probes; A11011
Anti-IgG de ratón	Alexa Fluor® 568* ²	Burro	1:1000	Molecular Probes; A10037
Anti-IgG de cabra	Alexa Fluor® 568* ²	Burro	1:1000	Molecular Probes; A11057
Estreptavidina	Alexa Fluor® 405* ³	-	1:1000	Molecular Probes; S32351

2.4.3. Controles de la técnica inmunohistoquímica

Para demostrar la especificidad de los anticuerpos empleados en los experimentos de la técnica inmunohistoquímica, se procesaron simultáneamente secciones que no fueron incubadas con el anticuerpo/s primario/s correspondiente/s, sino que se sustituyó este paso por una incubación del tejido en la solución diluyente. En ningún caso los controles negativos presentaron inmunotinción.

2.5. OBTENCIÓN DE IMÁGENES MICROSCÓPICAS

La mayoría de los preparados de los experimentos inmunohistoquímicos para microscopía óptica a campo claro fueron escaneados mediante un sistema de microscopía virtual Olympus VS120 acoplado a un sistema óptico (Olympus BX61VS), a dos cámaras (Olympus VC50, color; Olympus VS-XM10, monocromo) y a un ordenador que ejecuta el programa VS (Olympus). Con este sistema se pudo obtener una base de datos de preparaciones virtuales con una resolución de 0,17 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ (objetivo 40X) con acceso remoto a través del servidor *NetImage Server SQL* (Olympus) y desde cualquier ordenador que tuviera instalado el programa Olyvia 2.6 (Olympus), empleado para el visionado de las muestras y la toma de imágenes (en formato .vsi o .jpg con un tamaño de 1786x 877).

Otras imágenes de inmunohistoquímica para microscopía óptica de campo claro se obtuvieron con un microscopio convencional Nikon modelo Eclipse 80i, provisto de una cámara fotográfica digital Nikon DS-5M de 5 megapíxeles, conectada a un ordenador que ejecuta el programa ACT-2U (Imaging Software, Nikon Corporation 2004), tomadas con un tamaño de 2560x1920 en formato JPEG.

También se empleó un microscopio Olympus BX61 con una cámara acoplada (Olympus DP71) y el programa Cell-A (Olympus), para la toma de imágenes de inmunohistoquímica para campo claro, así como para la toma de imágenes de epifluorescencia, gracias a una fuente de fluorescencia (Olympus U-RFL-T) acoplada al microscopio.

Por otro lado, las imágenes de fluorescencia a microscopía confocal se obtuvieron con el microscopio láser confocal Leica SP5 acoplado a un ordenador. Este microscopio permite conocer la colocalización de dos o más moléculas en una misma célula, entre otras aplicaciones, al obtenerse

secciones ópticas muy finas, con un plano focal de 0,4 μm . Las fotos se adquieren con un tamaño 1024x1024 en formato .tif y son procesadas mediante el programa LAS AF Lite (Leica).

Finalmente, para el procesamiento de las imágenes digitales se utilizó el programa informático Adobe PhotoShop CS (7.0) y se montaron con el programa Microsoft Office PowerPoint (2010).

2.6. TÉCNICAS ESTEREOLÓGICAS DE RECUENTO CELULAR: DENSIDAD NUMÉRICA

La estereología es una técnica que combina la probabilidad geométrica y la estadística para cuantificar las propiedades geométricas tridimensionales de objetos de interés, utilizando información adecuadamente muestreada y basándose en principios generales de análisis sencillos (Howard y Reed 2004).

La técnica estereológica del disector óptico permite estimar el número de células por volumen (células/ mm^3) o densidad numérica (DN) y está considerada como el mejor método de muestreo para una estimación precisa de la densidad numérica de células.

Dicho procedimiento se empleó en el presente trabajo de Tesis Doctoral para cuantificar la densidad celular de las poblaciones neuronales que expresan SOM y PV y la población de células microgliales, en el hipocampo y giro parahipocampal de muestras humanas con patología de tipo Alzheimer y muestras control. La densidad numérica de las subpoblaciones de interneuronas PV y SOM en la corteza perirrinal de los ratones transgénicos, así mismo, se analizó también mediante estereología.

La aplicación de este método requirió un sistema de computación interactivo que comprende un microscopio convencional (Olympus BX61), una cámara digital (Olympus DP71), el programa informático NewCast (Olympus) con el sistema VIS 2.61.1.0. (Visiopharm Integrator System, Visiopharm®) y un microcator (Prior ProScan), que monitoriza los movimiento del eje Z.

Para poder llevar a cabo esta técnica los objetos de interés (en nuestro caso cuerpos celulares inmunomarcados) han de ser muestreados de manera uniforme, es decir, que en un área determinada cada objeto debe tener la misma probabilidad de ser contado. Es necesario delimitar el área de la región a medir y determinar el porcentaje de la muestra que se quiere estudiar (entre el 20 y el 50% del total), para que el programa realice un muestreo de la zona y seleccione al azar el primer punto, de manera que los puntos de muestreo consecutivos, equidistantes, también son seleccionados al azar, mediante un muestreo en forma de meandro (del inglés *meander sampling*) (ver figura 2.4). El área se selecciona manualmente con el objetivo de 2X o 4X y el muestreo se realiza con un objetivo de mayores aumentos (20X, 40X o 100X).

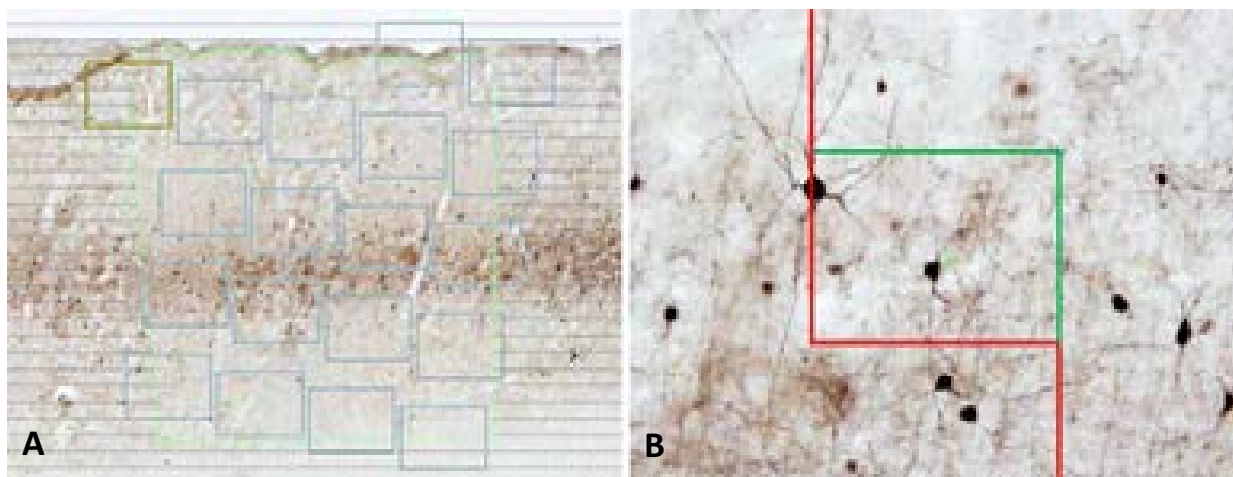


Figura 2.4. Representación de la técnica estereológica del disector óptico con la que se llevó a cabo el análisis de la densidad numérica de diferentes tipos celulares. A, el muestreo sistemático permite cuantificar las partículas contenidas en ventanas de conteo que se encuentran distribuidas al azar y equidistantes, y que ocupan una parte de la región de interés (no más del 50%); B, solo aquellos perfiles celulares que se encuentran en el interior del disector o en contacto con las aristas verdes son contados.

Para el análisis del tejido humano, se empleó una media de 6 secciones seriadas por individuo, separadas entre ellas por una distancia de 180 μm (ya que se muestreó una fracción de 1/6 y los cortes presentaron 30 μm de grosor), obteniendo así una representación global entre las coordenadas 17 mm y 35 mm del eje rostro-caudal de la región cuantificada. La corteza perirrinal de los animales de experimentación se estudió a lo largo de todo el eje rostro-caudal, con una media de 7-8 secciones por animal, distanciadas por 280 μm (fracción de 1/7 x 40 μm de grosor).

Para estimar la densidad numérica, el programa emplea disectores, cuadrículas o ventanas de conteo con un área conocida, que al multiplicarla por el grosor del corte, nos da el volumen de referencia necesario para la estimación del número de perfiles celulares mediante el método del disector óptico.

Finalmente, teniendo en cuenta el área de la región seleccionada, el grosor del corte y el número de perfiles celulares contados, se puede determinar el número de células por unidad de volumen o densidad numérica (DN), según la ecuación:

$$DN = \sum Q / \sum A \times h,$$

Donde $\sum Q$ es el número de perfiles somáticos, $\sum A$ es el sumatorio de las áreas (área de la ventana multiplicado por el número de ventanas cuantificadas), y h es la altura del disector o, en nuestro caso, el grosor del corte.

De este modo, se obtuvo la densidad numérica de cada una de las secciones y la media de las secciones se utilizó para obtener el valor correspondiente del sujeto y, posteriormente, de la media de los diferentes sujetos se halló la densidad numérica de cada grupo, presentando junto con estos datos la desviación estándar del grupo.

2.7. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE IMAGEN PARA LA CARGA AMILOIDE Y LA CARGA GLIAL

Para la cuantificación de la carga amiloide (% del área ocupada por los depósitos amiloides extracelulares OC-positivos, respecto a un área de referencia) y de la carga microglial (% del área ocupada por células microgliales positivas para Iba1 o P2ry€12, respecto a un área de referencia) en el tejido humano, se obtuvieron imágenes del hipocampo y del giro parahipocampal de preparados inmunoteñidos para dichos marcadores, a través del sistema de microscopía virtual Olympus VS120 explicado anteriormente en el apartado, empleando el objetivo 4X.

Las imágenes fueron procesadas con el programa de análisis de imagen Visilog 6.3 (Noesis). Primero se calibraron y transformaron en monocromáticas. Posteriormente, tras delimitar el área de referencia, la imagen de trabajo fue binarizada para permitir su análisis (eligiendo un umbral entre 0-255) (Fig. 2.5), de manera que al sumar el área seleccionada y la imagen binaria, se obtuvo una nueva imagen binaria con un punteado correspondiente al inmunomarcaje de la región de referencia. Finalmente, para la estimación del % del área inmunomarcada (carga), se calculó una relación entre el área inicial (100%) y la obtenida tras la binarización.

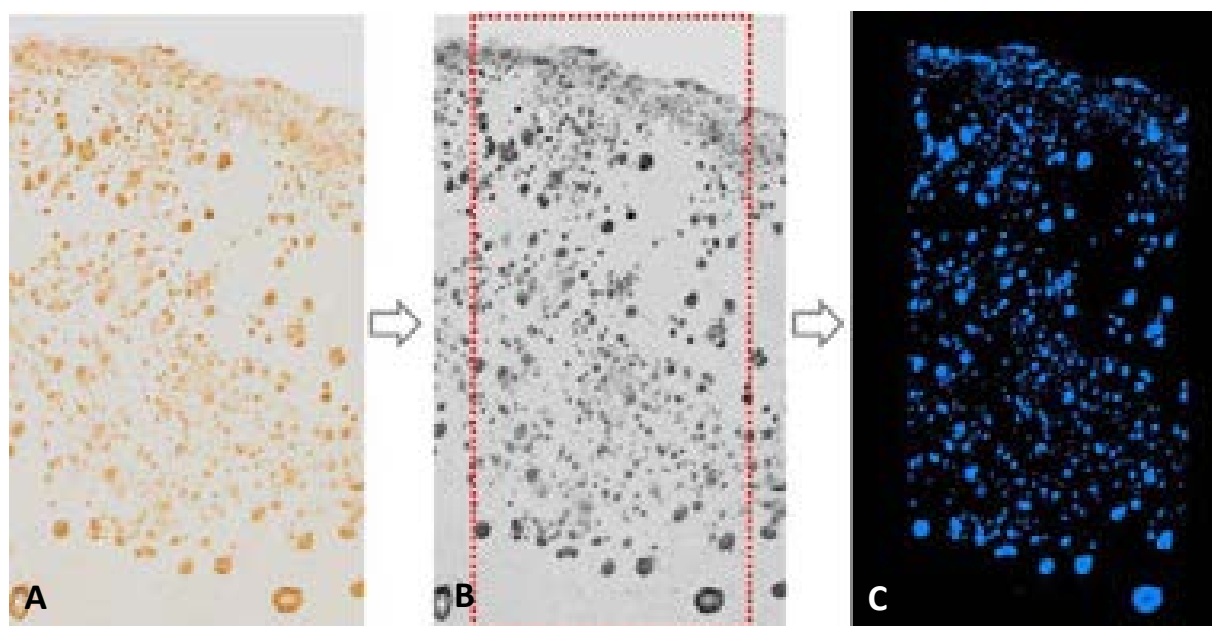


Figura 2.5. Proceso de binarización con el programa de análisis de imagen Visilog 6.3. En la imagen de la izquierda (A) se puede observar la fotografía original sin procesar de una sección de corteza perirrinal humana inmunoteñida con el anticuerpo OC para AB oligomérico, en medio (B) la imagen transformada en monocromática y con el área de interés seleccionada; y, a la derecha (C), la misma imagen tras el proceso de binarización. La inmunotinción aparece de color azul

Además de la cuantificación del área ocupada por la microglia en el hipocampo y en el giro parahipocampal, se estudió también la distribución del espacio ocupado por las células microgliales Iba1-positivas en el giro dentado mediante un análisis en cuadrícula. Para ello, las imágenes fueron procesadas de la misma manera y, una vez binarizadas, se aplicó una cuadrícula a cada imagen con un tamaño de cuadrado de $125000 \mu\text{m}^2$ (ver figura 2.6), tomando el área del cuadrado como área de

referencia, y los valores del espacio cubierto por la microglía en cada cuadrado fueron representados como un histograma de distribución.

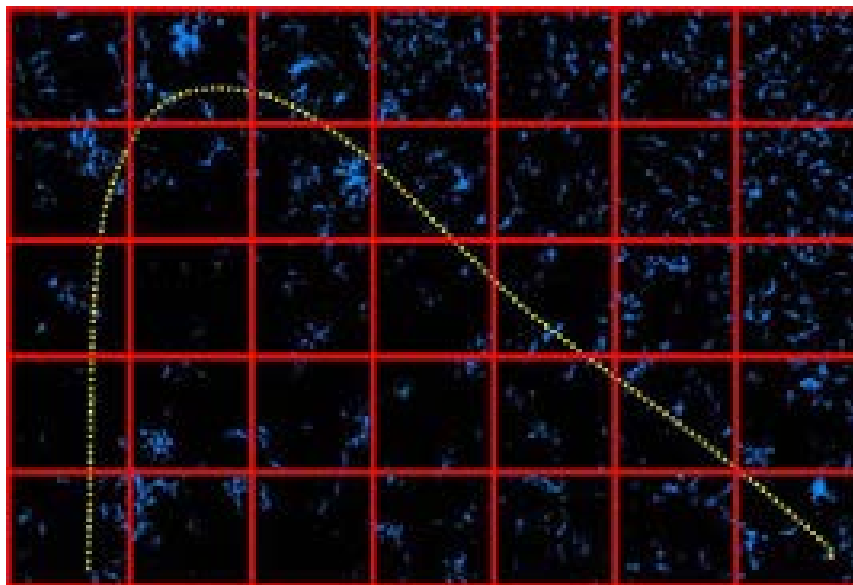


Figura 2.6. Análisis en cuadrícula de la distribución diferencial de las células Iba1-positivas en el giro dentado. Tras obtener las imágenes monocromáticas y binarias, se insertó una cuadrícula (de 125000 μm^2 cada cuadrado) en cada imagen y se analizó el espacio ocupado de las células microgliales en cada cuadrado de la plantilla.

Para la cuantificación de la carga astrogliar (% del área ocupada por células GFAP-positivas, respecto a un área de referencia) en el hipocampo y en la región parahipocampal, se empleó el mismo procedimiento que para la carga microglial, salvo que las imágenes fueron tomadas con el microscopio de epifluorescencia.

2.8. ANÁLISIS DE LA COMPACTACIÓN DE LAS PLACAS DE A β

El análisis de la compactación de las placas de A β se llevó a cabo en las muestras humanas. Las secciones inmunoteñidas con OC (fibras de oligómeros) se fotografiaron utilizando un microscopio Nikon Eclipse 80i (ver Apdo. 2.5.1), con el objetivo de 10x. Se cuantificaron tres secciones por individuo, utilizando el programa de análisis de imagen Visilog 6.3 (Noesis, Francia).

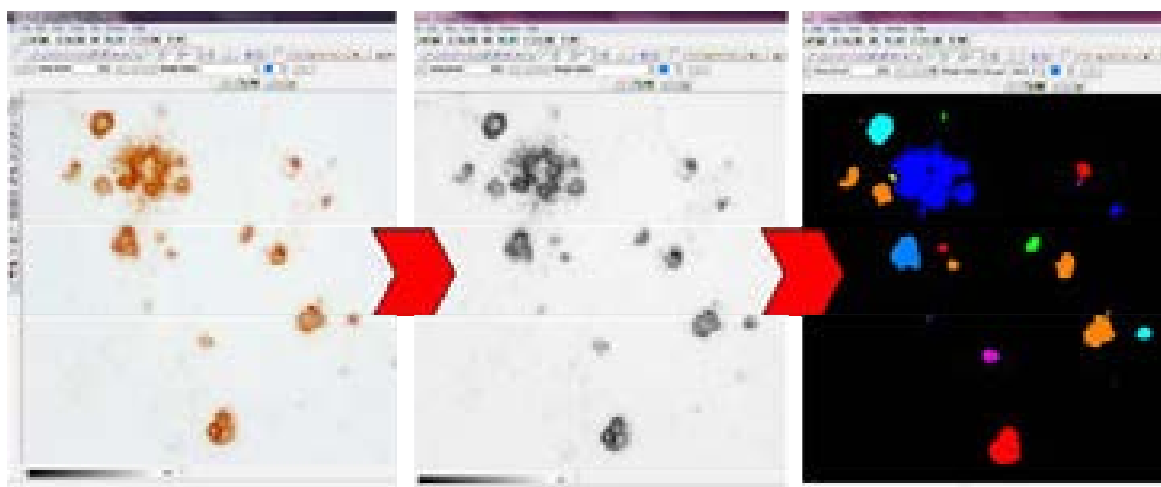


Figura 2.7. Cuantificación de la compactación de las placas. Mediante el programa Visilog, las imágenes de la inmunohistoquímica para OC reveladas con DAB (con este método de revelado se aprecian mejor las diferencias en la compactación que con DAB-níquel, que enmascara dichas diferencias) se pasaron 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.

La densidad de inmunotinción para OC se identificó mediante un umbral que se mantuvo a lo largo de todo el experimento (Fig. 2.7). 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 mm^2 que se midió utilizando el mismo programa).

2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos en el presente estudio se representaron con la media del grupo \pm la desviación estándar (SD).

Todos los análisis estadísticos se realizaron introduciendo los datos en el programa Sigma Stat32 3.5 (Advisory Statistics for Scientists) y GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc.). Para determinar la existencia de diferencias significativas entre los diferentes grupos de datos a comparar se aplicaron diferentes test estadísticos según si los datos seguían o no una distribución normal. Para los grupos de datos que presentaron una distribución normal se aplicaron test paramétricos como la prueba de análisis de varianza (ADEVA) de una vía seguido de un test de comparaciones múltiples (*Tukey* o *Bonferroni*) o la prueba *t de student* para comparaciones independientes entre dos grupos. Para los grupos de datos que no presentaron una distribución normal, se aplicaron pruebas no paramétricas (*Kruskal-Wallis* para comparaciones múltiples o *Mann-Whitney* en comparaciones independientes entre dos grupos). El nivel de significación en las pruebas fue de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) o $p < 0,001$ (***)

2.10. APÉNDICE

Tampones para la inmunohistoquímica

- **Tampón fosfato (PB) 0,4 M, pH 7,4**

NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O (1.06346, Merck)	13,8 g
NaHPO ₄ · 2H ₂ O (1.06580, Merck)	53,4 g
H ₂ O desionizada	hasta 1000mL
Disolver y ajustar el pH a 7,4	
- **Tampón fosfato salino (PBS) 0,1 M, pH 7,4**

NaCl (131659, Panreac)	9 g
PB 0,4 M, pH 7,4	250 mL

H₂O desionizada hasta 1000 mL
 Disolver y ajustar el pH a 7,4.

- **Tampón citrato sódico, pH 6**

C₆H₅Na₃O₇·2H₂O (131655, Panreac) 1,47 g
 H₂O desionizada hasta 100mL
 Disolver y ajustar el pH a 6.

Solución de fijación

- **Paraformaldehído 4%, L-lisina 75 mM, metaperyodato sódico 10 mM (PLP) en PB 0,1 M, pH 7,4**

Paraformaldehído (1.04005, Merck) 4 g
 L-lisina monoclórhidrato (1.05700, Merck) 1,37 g
 Metaperyodato sódico (1.06597, Merck) 0,21 g
 PB 0,4 M, pH 7,4 50 mL
 H₂O desionizada hasta 100 mL

Modo de preparación:

1. Disolver 4 g de paraformaldehído en 30-35 mL de agua desionizada previamente calentada a 60 °C. Si es necesario, añadir unas gotas de NaOH para su completa disolución.
2. Filtrar y enrasar con agua desionizada 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 0,2 M, pH 7,4.

Solución crioprotectora

- **Sacarosa 30%**

Sacarosa (131621, Panreac) 30 g
 PBS 0,1 M pH 7,4 hasta 100 mL

Portaobjetos gelatinizados

- **Solución de gelatina**

Gelatina oro (251336, Panreac) 1 g
 Sulfato de cromo y potasio (141284, Panreac) 0,1 g
 H₂O desionizada 200 mL

Modo de preparación:

1. Se desengrasan los portaobjetos en una mezcla de alcohol absoluto y éter (1:1) durante al menos un día.
2. Secar los portaobjetos.

3. Disolver la gelatina en agua desionizada calentada a 60 °C y añadir el alumbre de cromo posteriormente hasta su disolución.
4. Sumergir los portaobjetos en la solución de gelatina durante 15 segundos, dejar secar y sumergir de nuevo durante 15 segundos más en agitación.
5. Dejar secar en la estufa a 37 °C durante 24 horas. Tras el gelatinado de los portaobjetos, éstos son viables durante al menos dos meses desde su preparación.

Solución de revelado para microscopía de campo claro

- **Solución de 3-3'-diaminobencidina (DAB) tetrahidro-clorhídrico 0,05% - Níquel 0,03%:**

DAB (D5637, Sigma-Aldrich)	0,3 g
Tris 50 mM (Trizma®, T1503, Sigma-Aldrich)	0,06 g
HCl	hasta ajustar pH
Níquel Sulfato amónico (464545, Farmitalia Carlo Erba)	0,012 g
PBS 0,1 M pH 7,4	15 mL
H ₂ O desionizada	50 mL

Modo de preparación:

1. Añadir 0,06 g de Tris 50mM en 50 mL de agua desionizada y ajustar el pH a 7,4 con unas gotas de ácido clorhídrico.
2. Disolver 0,3 g de DAB en el tampón Tris-Clorhídrico.
3. Filtrar y almacenar la solución en alícuotas de 500 µL a 20 °C.
4. Para la preparación de la solución de revelado, diluir previamente 0,012 g de níquel en 15 mL de PBS, y a continuación añadir una alícuota de DAB-Tris previamente descongelada. Por último, filtrar de nuevo antes de usar y añadir el peróxido de hidrógeno (0,03 % en la solución final).

Protocolo de deshidratación y montaje

PBS 0,1 M pH 7,4	10 min
H ₂ O desionizada	10 min
Etanol 70°	10 min
Etanol 96°	10 min
Etanol 100°	10 min
Disolvente natural (Xileno) (141769.2711, Panreac)	15 min
Montaje con DPX (360294H, BHD)	

Medio de montaje para inmunohistoquímica fluorescente

- **DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2.]octano) 3% para inmunohistoquímica fluorescente**

DABCO (Sigma-Aldrich, D-2522)	3g
-------------------------------	----

Glicerol (141339, Panreac)	50 mL
PBS 0,1 M pH 7,4	50 mL
Mantener la solución a 4 °C y en oscuridad.	

MATERIALES Y MÉTODOS SUPLEMENTARIOS

Para complementar los resultados obtenidos con las técnicas inmunohistoquímicas se han realizado estudios bioquímicos (PCR a tiempo real, *western-blot*) y estudios *in vitro* en colaboración con el laboratorio del Dr. Javier Vitorica (Universidad de Sevilla; IBIS).

2.11. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS

Las muestras humanas utilizadas (hipocampo) en los estudios bioquímicos proceden de los mismos individuos que las utilizadas para los estudios inmunohistoquímicos (ver Tabla 2.1), y han sido cedidas por los mismos biobancos (*Banco de Tejido para Investigación Neurológica* de Madrid, y del *Banco de Tejidos Neurológicos del Servicio de Anatomía Patológica IDIBELL-Hospital Universitario de Bellvitge de Barcelona*). El uso de las mismas muestras humanas en ambos laboratorios (de la Universidad de Málaga y de la Universidad de Sevilla) ha permitido una mejor correlación e interpretación de los datos con las diferentes técnicas. Mientras que para los estudios inmunohistoquímicos las muestras fueron previamente fijadas, para los estudios bioquímicos las muestras una vez extraídas se congelaron directamente a -80°C hasta su uso, para evitar la degradación de proteínas y ARN. Posteriormente, se dividieron aun congeladas en porciones de 70-90 mg para la extracción de proteínas, ARN o fracción soluble

Por otro lado, las muestras de hipocampo de ratones transgénicos APP/PS1 se obtuvieron por disección una vez anestesiados los animales con pentobarbital sódico (Dolethal®, 60 mg/Kg) y perfundidos transcárdialmente con tampón fosfato salino (PBS) 0,1 M pH 7,4 durante 5 minutos a un flujo continuo de 10 ml/minuto, utilizando una bomba de perfusión (DINKO Mod. D-25V). Las muestras obtenidas se conservaron a -80 °C hasta su posterior uso.

2.11.1. Aislamiento de ARN y proteínas a partir de muestras de 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 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.

En el proceso de extracción del ARN es muy importante que tanto el material de trabajo como los reactivos estén libres de ARNasas, por lo que se ha tratado el agua con dietilpirocarbonato (DEPC) al 0,1% (p/v) (Fedorcsák 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 ARNasas. La purificación del ARN y su posterior recuperación usando este sistema se ha realizado siguiendo los pasos que se indican en la Tabla 2.6. 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 2.6. 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

2.11.2. Comprobación de la integridad del ARN purificado

Para comprobar la integridad del ARN purificado utilizamos *Agilent RNA 6000 Nano Kit* como soporte electroforético y *Agilent 2100 Bioanalyzer* como instrumento de detección y análisis. Este sistema permite llevar a cabo una electroforesis en gel mediante el uso de un chip, sobre el cual se carga la matriz del gel, el fluoróforo que permitirá llevar a cabo la visualización del RNA y la muestra correspondiente. Tras la electroforesis el sistema de análisis recoge la fluorescencia emitida por la muestra, previamente estimulada con láser, creando un electroferograma (fluorescencia/tiempo). El electroferograma permite conocer la calidad del RNA generando, mediante el uso de un software específico, el RIN (*RNA Integrity Number*; Número de Integridad del ARN). El RIN establece una clasificación numérica de la calidad del RNA que comprende valores del 1 al 10, siendo 1 el RIN de un ARN totalmente degradado y 10 el RIN de un ARN perfectamente conservado. Tras llevar a cabo el análisis de integridad de ARN de nuestras muestras hemos obtenido un RIN medio de 2,54, indicando una muy baja calidad del ARN utilizado en este trabajo.

2.11.3. 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.

2.11.4. 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 2.7, 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 ug de ARN de nuestras muestras en un volumen final de 50 ul 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 ul 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 2.7. 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.

2.11.5. 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).

El sistema ABI-Prism 7900 de Applied Biosystems combina un termociclador, un detector de fluorescencia y un software específico de amplificación. Es capaz de detectar fluorescencia entre 500 nm y 660 nm. Para inducir la fluorescencia durante la PCR, una luz proveniente de una lámpara de tungsteno-halógena es distribuida simultáneamente a los 96 pocillos a través de una matriz de fibras ópticas. La fluorescencia resultante vuelve de forma secuencial a través de las fibras y se dirige hacia un espectrógrafo con una cámara CCD (*charge-coupled device*).

Se han 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 problemas como controles, empleando la ecuación de Livak y Schmittegen ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), 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 2.8.

Tabla 2.8. 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 (μ l)
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 esta sondas suministradas por Applied Biosystemns 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 2.9.

Tabla 2.9. 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 (μ l)
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 2.10. 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 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 2.11 se muestra la secuencia de los cebadores empleados y en la Tabla 2.12 las sondas Taqman utilizadas.

Tabla 2.10. 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 2.11. 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	
	GDNFlo	GCACCCCGATTTTTGC	
GFAP	GFAPup	CTCCAACCTCCAGATCCGAG	NM_010277
	GFAPlo	TCTGACACGGATTTGGTGTCC	
NPY	NPYmmUP	CATCAATCTCATCACCAGACAGA	NM_023456
	NPYmmLO	AAGGGTCTTCAAGCCTTGTTCC	
SOM	SOMmmUP	AGGATTTGCCCCAGGCAGCT	NM_009215
	SOMmmLO	TGCAGCCAGCTTTGCGTTCC	

Tabla 2.12. Sondas Taqman para RT-PCR. Se indican las sondas Taqman de Applied Biosystems, con su referencia, utilizadas para humano o ratón en el análisis de expresión de ARNm mediante RT-PCR Real Time.

Sonda (humano)	Referencia	Sonda (ratón)	Referencia
CCL2	Hs00234140_m1	TNFalfa	Mm00443258_m1
CCR2	Hs00704702_s1	GAPDH	Mm99999915_g1
CD11b	Hs00355885_m1	P2ry12	Mm01950543_s1
CD36	Hs01567185_m1	CX3CR1	Mm02620111_s1
CD3E	Hs01062241_m1	CD45	Mm01293577_m1
CD45	Hs04189704_m1	Iba-1	Mm00479862_g1
CD68	Hs02836816_g1	CD68	Mm03047340_m1
CX3CR1	Hs01922583_s1	CD11b	Mm00434455_m1
FAS-L	Hs00181225_m1	GFAP	Mm01253033_m1
GAPDH	Hs03929097_g1		
GDNF	Hs00181185_m1		
GFAP	Hs00909236_m1		

Sonda (humano)	Referencia	Sonda (ratón)	Referencia
IBA-1	Hs00610419_g1		
Ki67	Hs01032443_m1		
MRC-1	Hs00267207_m1		
MSR-1	Hs00234007_m1		
NPY	Hs00173470_m1		
P2ry12	Hs01881698_m1		
Pu.1	Hs02786711_m1		
PV	Hs00161045_m1		
SIRP β 1	Hs01092173_m1		
SOM	Hs00356144_m1		
TNF- α	Hs00174128_m1		
β -Actina	Hs99999903_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%. 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 μ l de patrón junto con 4 μ l de tampón de carga, así como 5 μ l de muestra y 5 μ l 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®.

2.11.6. Western-Blot (WB)

Esta técnica permite la cuantificación de proteínas específicas presentes en el tejido. Comienza con la electroforesis de las proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS o poliacrilamida-SDS-Urea, 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 2.13 y en la Tabla 2.14.

Tabla 2.13. 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>staging</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 2.14. 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>staging</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 trampón 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 2.15. 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 2.15. 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 obtencion	Referencia
Anti-Aβ (6E10)	1:5000	4,5 kDa (1 mer)	Ratón	Signet; Ref.: 6E10
AT8 Fosfo-Tau (Ser199/202-Thr205)	1:1000	79 kDa	Ratón	Thermo-Scientific; ab34719
AT100 Fosfo-Tau (Thr212-Ser214)	1:1000	79 KDa	Ratón	Innogenetics
NeuN			Ratón	
B-actina	1:1000	42 KDa	Ratón	Sigma-Aldrich

2.11.7. Aislamiento de proteínas solubles (S1)

Otra técnica empleada para la obtención de proteínas es la que se lleva a cabo en medio acuoso en ausencia de detergentes. El uso de esta técnica de basa en la necesidad de usar tejido fresco para ciertas aproximaciones bioquímicas. Este método de solubilización nos permite separar la fracción soluble de proteínas extracelulares y citosólicas del contenido de membranas lipídicas del tejido procesado, por ultracentrifugación diferencial.

Para la obtención de fracción soluble S1 hemos utilizado tejido de hipocampo de humanos. En primer lugar disgregamos el tejido en tampón isotónico tris-salino (1:5 p/v) al que añadimos un cocktail de inhibidores de proteasa y fosfatasa. La disgregación se lleva a cabo usando las tijeras apropiadas hasta que el tejido queda totalmente fraccionado; seguidamente pasamos la suspensión de tejido resultante a un homogenizador Dounce's (Wheaton) y lo sometemos a 15 pases con el pistilo de menor diámetro (paso de luz: 0.089-0.14mm) y 15 pases con el de mayor diámetro (paso de luz: 0.025-0.076 mm). El homogenado obtenido se centrifuga a 100000 xg durante 1 hora a 4°C (Optima Max, Beckman Coulter). El sobrenadante que obtenemos de esta ultracentrifugación es lo que

consideramos fracción proteica soluble o S1 y el precipitado serán los restos de membranas, agregados proteicos y proteínas insolubles. Ambas fracciones se guardan por separado a -80°C hasta su uso.

2.12 ESTUDIOS IN VITRO

2.12.1 Cultivos de líneas celulares

Línea microglial BV2 / Línea astroglial WJE

Las células microgliales de la línea BV2 y las células astrogliales de la línea WJE son cultivadas de forma rutinaria en medio DMEM-F12 (PAA) suplementado con glutamina 2 mM, suero fetal bovino (10%), 100 U/ml de penicilina (PAA) y 100 µg/ml de estreptomycin (PAA) e incubadas a 37°C, 5% CO₂. Estas células se subcultivan 2 veces por semana para mantener un grado de confluencia adecuado al crecimiento celular. Mediante un rascador se recogen las células del frasco de cultivo y se resuspenden en medio de cultivo correspondiente haciendo diluciones 1:10 antes de sembrar en un frasco nuevo. El número de células y soporte utilizado en cada ensayo van a depender de las condiciones experimentales empleadas.

2.12.2. Cultivos Celulares Primarios

Cultivos microgliales primarios

Los cultivos primarios microgliales se realizan según se describe en Jimenez et al, 2008 utilizando ratones neonatales (2-3 días). Los cerebros diseccionados se tratan, 5 min a 37°C, con tripsina-DMEM-EDTA (Biowhittaker, Cambrex, Belgium). El tratamiento se detiene utilizando medio completo DMEM-F12 + 10% FBS y las células se disocian mecánicamente. Después de la disociación, los restos celulares se eliminan por filtración y las células se siembran (a una densidad aproximada de 250000 células/ml) en placas tratadas con poli-D-lisina y conteniendo DMEM-F12 + 10% FBS (con glutamina, aminoácidos no esenciales y 1% penicilina-estreptomycin). La incubación se realiza a 37°C en atmósfera humidificada y a 5% de CO₂. El medio se reemplaza cada 4-5 días. Después de 15 días en cultivo, los astrocitos se retiran por disociación suave, y las células microgliales se estimulan mediante incubación durante 3h con LPS. Una vez estimuladas, la expresión de los distintos marcadores se realiza mediante qPCR a partir de cDNA preparado a partir de los RNAs de los distintos cultivos.

Para la preparación de células microgliales adultas se utilizan cerebros obtenidos de ratones WT de 3 meses de edad. Las células son disociadas como se indica arriba, y la microglia se aísla mediante centrifugación en gradiente discontinuo de Percoll (37% y 25%) seguido por el aislamiento *cell-sorting* utilizando anti-CD11b-APC. Una vez aisladas, las células son estimuladas, 3h, con LPS siguiendo el protocolo anterior.

Cultivos neuronales primarios

Los cultivos neuronales primarios de la línea celular N2a se realizaron según se describe en (Jimenez et al. 2014). Brevemente, Las células N2a se siembran en una densidad de 25000 células/cm² en un medio rico en glucosa DMEM/OptiMEM (50%-50%) suplementado con un 2mM de glutamina y un 5% de suero fetal bovino en presencia penicilina y estreptomycin (100 unidades/mL y 0,01 mg/ml, respectivamente). La incubación se realiza a 37°C en atmósfera humidificada y a 5% de CO₂.

2.12.3. Tratamiento de Estimulación de Cultivos Celulares con Fracción S1 de Humanos

Para llevar a cabo el tratamiento con S1 humanos utilizamos cultivos de línea microglial N13, y cultivos primarios procedentes de ratón de microglía y astrocitos (descritos previamente).

En el caso de los cultivos microgliales de N13, sembramos 90.000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos (área de cultivo: 1,8 cm²). Para el uso de células procedentes de cultivos primarios, sembramos 500.000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos. Tras el mantenimiento y crecimiento de los cultivos (24 h para la línea N13 y 15 días para los cultivos primarios) llevamos a cabo el tratamiento de los mismos utilizando la fracción soluble S1 obtenida de las muestras humanas. Para ello, tras haber retirado el medio de cultivo antiguo y haber añadido medio nuevo, añadimos un volumen de S1 manteniendo una proporción 1/10 v/v que dejaremos durante 3 horas de tratamiento. El medio de cultivo utilizado será el específico de la línea celular/primaria tratada (detallado anteriormente). Transcurridas las 3 horas de tratamiento, retiramos el medio de cultivo y recogemos las células utilizando el reactivo Trisure, ayudándonos de un rascador levantamos las células de la placa y las pasamos a un tubo de plástico donde el proceso a seguir para la extracción de ARN y proteínas será el mismo utilizado para la obtención de ARN y proteínas a partir de tejido de hipocampo humano. Una vez obtenido el ADNc pasamos a medir todos aquellos marcadores de interés mediante *western blot* y RT PCR Real Time.

2.12.4. Determinación de la toxicidad de las fracciones solubles S1 de hipocampo humano (individuos Braak II, Braak III-IV y Braak V-VI) y modelos APP/PS1 (6 y 18 meses de edad) mediante citometría de flujo.

Los distintos tipos celulares (BV2, línea microglial; WJE, línea astrogial) se tratan, 24 horas, en presencia de 1 µg de proteína S1 procedentes de hipocampo humano o de animales APP/PS1. La toxicidad se determina utilizando Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Immunostep Ref. ANXVKF-100T). Este kit permite distinguir entre células intactas (las que se encuentran en el cuadrante Q3; que son Annexin V-FITC y PI negativas), células en apoptosis “temprana” (las que están en cuadrante Q4; que son positivas para Annexin V-FITC y negativas para PI) y células en apoptosis tardía o muertas (las que están en cuadrante Q2; que son positivas para Annexin V-FITC y para PI). El cuadrante Q1 refleja daño necrótico. PI: Ioduro de propidio. Los tratamientos se realizan con S1 de humanos (10 µg/100µl de medio) para la curva se usa diluciones de estos S1 (10 µg, 1 µg y 0.1 µg /100 µl de medio) durante 24 horas en ausencia de suero.

2.12.5. Determinación de la toxicidad de las fracciones S1 de hipocampo de ratón APP/PS1 sobre cultivos neuronales primarios

Los cultivos neuronales primarios fueron realizados tal y como se describe en Jimenez et al (2011). Brevemente, los cerebros embrionarios (E18-20) o postnatales (P1) fueron diseccionados y tratados, durante 5 min, con medio tripsina-DMEM-EDTA (Biowhittaker, Cambrex, Belgium). El tratamiento se paró utilizando DMEM con 10% FBS y las células se disociaron mecánicamente. Tras la disociación mecánica, los restos fueron eliminados mediante filtración (40 µm, BD Falcon) y las células fueron sembradas (a una densidad de 60.000 células/ml) en medio Neurobasal con suplemento B27 (conteniendo glutamina, 1% penicilina-estreptomicina y gentamicina) en placas Nunc de 12- o 96 pocillos tratadas con poli-D-lisina (Sigma-Aldrich). Las células fueron cultivadas a 37° C, en atmosfera humidificada y a 5% de CO₂. El medio fue reemplazado cada 4 días. Después de 13-15 días en cultivo, las células fueron tratadas (durante 48 h) con las diferentes fracciones solubles (S1) obtenidas de animales WT o APP/PS1 de 6 o 18 meses de edad. Después de la incubación, las células fueron lavadas (con PBS frío) y extraídas utilizando Tripure como se ha descrito previamente. La viabilidad neuronal fue medida mediante expresión del marcador NeuN por *western blot*, mientras que la de la población que expresa PV fue analizada por qPCR.

2.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos llevados han sido repetidos una media de 3 veces. El método de análisis estadístico varía según las muestras empleadas. El análisis estadístico se ha desarrollado con el programa estadístico Statgraphics v3.1. En aquellos datos que siguen una distribución normal los resultados mostrados reflejan el valor medio de los experimentos realizados respecto al grupo control. Los datos que no siguen una distribución normal, han sido representados utilizando un

diagrama de caja (*Box and whisker plot*) que refleja la mediana, el valor mínimo y el valor máximo de los grupos representados. Con estos datos podemos conocer la distribución que siguen los datos dentro de cada grupo. En el estudio de las muestras humanas, los datos no siguen una distribución normal, por tanto empleamos un test no paramétrico (Kruskal-Wallis). Para aquellas muestras que se ajustan a una distribución normal, comparamos los datos mediante el test *t de student* o *t test*, si se trata de dos poblaciones independientes, y mediante el ADEVA (análisis de varianzas), seguido del test de comparación múltiple Tukey, si comparamos varios grupos entre sí. Consideramos la existencia de diferencias estadísticamente significativas cuando obtenemos un valor $p < 0,05$.

3. Resultados



La mayoría de la información a nivel molecular y/o celular sobre la evolución de la patología de la enfermedad de Alzheimer ha sido obtenida principalmente en modelos transgénicos que portan una o varias mutaciones del Alzheimer familiar. Sin embargo, estos modelos animales no parecen mimetizar correctamente la evolución de la patología observada en los pacientes siendo la mayor limitación la escasa o tardía muerte neuronal. Este hecho subraya la necesidad de caracterizar en detalle la evolución de los procesos patológicos en muestras procedentes de pacientes para, por una parte, comprender la etiología de la AD y, por otra parte, mejorar los modelos existentes para que resulten útiles en la experimentación preclínica.

En base a lo expuesto, este trabajo de Tesis Doctoral se ha centrado en el estudio neuropatológico de muestras humanas *post mortem* (hipocampo y giro parahipocampal) catalogadas por los Biobancos de procedencia según los estadios de Braak (desde Braak II a Braak VI) para la patología tau. Además, se han incluido como controles muestras de individuos sin patología de edad similar. De forma paralela se ha realizado un estudio comparativo de aquellos resultados más relevantes con muestras de modelos transgénicos APP/PS1. En este sentido, una de las líneas de investigación de nuestro grupo durante años ha sido la caracterización de modelos transgénicos de AD y la búsqueda de biomarcadores de interés para su uso en estudios preclínicos de potenciales fármacos. De especial interés han sido los aspectos relacionados con la vulnerabilidad neuronal, la degeneración axonal y sináptica, las alteraciones de la proteostasis celular y su relación con el metabolismo de APP y la producción de Abeta, y en los últimos años el proceso neuroinflamatorio, en regiones altamente vulnerables en los pacientes como son el hipocampo y la corteza entorrinal. Otro de los objetivos del grupo ha sido evaluar la eficacia de diversas estrategias terapéuticas en estos modelos, analizando su efecto sobre la progresión de la patología y los déficits cognitivos. Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral he colaborado activamente con el grupo de investigación en estos trabajos con modelos transgénicos (ver Anexo de publicaciones), y que han sido el eje primordial para plantear el estudio que aquí se presenta en muestras humanas y realizar el análisis comparativo con los modelos. A continuación, se describen los principales hallazgos en estos modelos animales y se indican las referencias donde se han publicado (los artículos científicos se adjuntan como Anexos):

1. Hemos demostrado que el modelo APP_{751SL}/PS1_{M146L} presenta muerte neuronal significativa, tanto de neuronas piramidales como de interneuronas, en la corteza entorrinal a edades tempranas (6 meses) relacionada con la acumulación de Abeta extracelular y el desarrollo de una respuesta neuroinflamatoria citotóxica. Este resultado es de gran relevancia ya que la mayoría de los modelos transgénicos carecen o muestran una escasa pérdida de neuronas a edades avanzadas. En este trabajo se pone de manifiesto, además, la existencia de un perfil regional diferente en los mismos animales en la respuesta inflamatoria, siendo de naturaleza citotóxica en la corteza entorrinal y neuroprotectora en el hipocampo. (Moreno-Gonzalez et al. 2009); ver Anexo.

2. En relación con la vulnerabilidad selectiva de poblaciones de interneuronas SOM/NPY en el hipocampo, que previamente había demostrado nuestro grupo en el modelo APP/PS1 (Ramos y col., 2006), en este nuevo trabajo demostramos la existencia de una pérdida significativa de interneuronas que contienen la proteína ligadora de calcio calretinina (CR) en el hipocampo de este modelo desde los 4 meses de edad en paralelo al inicio de la patología amiloide. Esta subpoblación neuronal juega un papel crucial en la generación de actividad sincrónica rítmica en el hipocampo controlando a otras interneuronas. Por tanto, las alteraciones tempranas de las redes inhibitorias hipocampales, como consecuencia de la muerte de estas interneuronas CR-positivas, podrían ser las responsables de los déficits cognitivos observados en las fases iniciales de la enfermedad de Alzheimer. Estos resultados, junto con otros previos del grupo, demuestran la existencia de un proceso neurodegenerativo temprano en el hipocampo de este modelo y validan su uso para estudios preclínicos de terapias neuroprotectoras. (Baglietto-Vargas et al. 2010); *ver Anexo*.
3. La ausencia de una pérdida masiva de neuronas es una limitación de los modelos transgénicos y la principal discrepancia respecto a los pacientes, por ello decidimos analizar el mecanismo/agente implicado en este proceso en nuestro modelo APP/PS1. En este trabajo demostramos que a edades tempranas predomina la fracción soluble APP α , que a través de receptores de IGF1 e insulina, induce fosforilación de la vía PI3k/Akt/GSK-3 β y en consecuencia promueve una acción neuroprotectora. La activación de esta vía podría influenciar en la limitada fosforilación de tau y degeneración neuronal observada en la mayoría de los modelos. Sin embargo, a edades avanzadas se produce un aumento de las formas oligoméricas solubles de A β inhibiendo la fosforilación de esta vía y por tanto disminuyendo la supervivencia neuronal. (Jimenez et al. 2011); *ver Anexo*.
4. Otro aspecto importante que hemos caracterizado en este modelo APP/PS1 ha sido la patología axonal temprana que tiene lugar en el hipocampo. Este modelo desarrolla numerosas distrofias neuríticas alrededor de las placas amiloides. En este trabajo demostramos la naturaleza axonal/sináptica de estas distrofias y su relación con la alteración del sistema de proteostasis celular y producción de Abeta. Estas distrofias axonales acumulan abundantes vesículas autofágicas como resultado de alteración del citoesqueleto y fallos en el transporte axonal. Es de destacar que estas alteraciones también afectan a los terminales presinápticos pudiendo representar el sustrato morfológico de la disfunción sináptica que precede a la pérdida sináptica y neuronal en el hipocampo. (Sanchez-Varo et al. 2012); *ver Anexo*.
5. En relación con el trabajo anterior, hemos analizado la progresión de la patología axonal con la edad en el hipocampo del modelo APP/PS1 y su posible relación con la disfunción del sistema de degradación proteica autofagia/lisosomal y producción de A β . Existe una

alteración progresiva del citoesqueleto con disminución de las proteínas motoras quinesina y dineína, junto con una reducción de la actividad lisosomal responsable de la acumulación de vesículas autofágicas y proteínas ubiquitinadas dentro de las distrofias axonales. Estas deficiencias de la degradación lisosomal se asocian con un aumento del metabolismo de APP y la producción de A β . Este efecto sobre el metabolismo de APP parece estar directamente implicado en la acumulación sináptica de A β y la propagación de la patología amiloide entre regiones conectadas sinápticamente. (Torres et al. 2012); *ver Anexo*.

6. Hemos analizado el potencial terapéutico de la administración oral de carbonato de litio, un fármaco prescrito para los trastornos bipolares, sobre la progresión de la patología en el hipocampo de nuestro modelo transgénico APP/PS1. Este tratamiento se inició antes de que comenzara la patología amiloide en esta región cerebral y se extendió durante 6 meses. Los resultados revelaron una mejora de los déficits cognitivos junto un notable efecto neuroprotector previniendo la muerte de las interneuronas SOM/NPY y disminuyendo la formación de distrofias axonales. Es de destacar que el tratamiento con litio produjo una modificación de las propiedades de las placas amiloides siendo éstas más pequeñas, menos compactas y con un menor halo oligomérico tóxico. Este nuevo mecanismo de acción del litio, reduciendo la capacidad tóxica de las placas, podría representar una vía de interés terapéutico alternativa frente a los continuos fracasos clínicos dirigidos a reducir la carga amiloide. (Trujillo-Estrada et al. 2013); *ver Anexo*.
7. Siguiendo con la caracterización del modelo APP/PS1, hemos analizado con detalle el proceso neurodegenerativo en la región del subículo. Esta región se afecta en fases iniciales de la enfermedad en los pacientes y tiene un papel clave en el flujo de información entre el hipocampo y la corteza entorrinal. La patología amiloide se inicia en la región del subículo progresando a otras regiones hipocampales. La acelerada acumulación de A β extracelular ocurre en paralelo con una pérdida de neuronas (piramidales e interneuronas) y el desarrollo de una patología axonal/sináptica desde edades tempranas. Estos resultados demuestran que esta región presenta un fenotipo patológico acusado y por tanto es una región de interés para evaluar terapias dirigidas a modificar el curso de la enfermedad y proteger del daño neuronal. (Trujillo-Estrada et al. 2014); *ver Anexo*.

En base a estos trabajos, y a otros previos del grupo, se planteó la necesidad de validar en muestras *post mortem* de pacientes de Alzheimer los resultados obtenidos en los modelos transgénicos con objeto por un lado de avanzar en el conocimiento de los mecanismos implicados en el proceso neurodegenerativo y por otro, aportar información relevante para la posible selección y/o mejora de los modelos animales actualmente existentes para esta enfermedad neurodegenerativa.

Teniendo en cuenta lo expuesto, en esta Tesis Doctoral se ha realizado en primer lugar un estudio detallado de la patología tau (capítulo 1 de Resultados) y de la patología A β (capítulo 2 de Resultados) de las muestras humanas *post mortem* procedentes de los distintos Biobancos como paso primordial para conocer el grado de afectación de ambas alteraciones proteicas en cada uno de los casos de estudio y las posibles diferencias en las distintas regiones cerebrales. Además, la patología amiloide ha sido analizada en paralelo con la de nuestro modelo transgénico de amiloidosis APP_{751S}L/PS1_{M146L}. En segundo lugar, se ha estudiado el proceso de activación glial (microglial y astrogial) y su papel en la progresión de la patología en estas muestras humanas y comparando estos resultados con lo que ocurre en modelos animales (Capítulo 3 de Resultados; a partir de estos resultados se está preparando un manuscrito que será enviado en breve para su publicación). En tercer lugar se ha analizado el proceso neurodegenerativo de poblaciones de interneuronas en regiones como el hipocampo y la corteza perirrinal, en esta última región se ha hecho un estudio comparativo con el modelo transgénico APP/PS1 (Capítulo 4 de Resultados; [Sanchez-Mejias et al.](#) manuscrito bajo revisión en la revista J. Alz. Dis.). En último lugar se ha realizado un estudio del efecto del humo del tabaco, un factor medioambiental de gran repercusión en la sociedad humana, sobre la progresión de la patología en un modelo transgénico APP/PS1 (Capítulo 5 de Resultados; estos resultados han sido publicados en la revista Nature Commun. (Moreno-Gonzalez et al. 2013); *ver Anexo*).

Los distintos objetivos de la presente Tesis Doctoral han sido abordados fundamentalmente mediante técnicas inmunohistoquímicas, estereológicas y de análisis de imagen en secciones de tejido humano *post mortem* y de modelos transgénicos APP/PS1. Los datos de inmunotinción obtenidos en las muestras humanas de individuos controles e individuos con patología tau en estadios Braak II, Braak III-IV y Braak V-VI han sido complementados con estudios moleculares de *Western blots* y RT-PCR utilizando, en la mayoría de los experimentos, muestras de hipocampo procedentes de los mismos individuos. Además, se han llevado a cabo estudios *in vitro* y análisis por citometría de flujo para estudiar el efecto de las fracciones solubles de hipocampo de las muestras humanas y de los modelos APP/PS1 sobre la viabilidad neuronal y glial. Todos estos estudios moleculares e *in vitro* han sido realizados en colaboración con el laboratorio del Dr. Vitorica (Universidad de Sevilla), con quien nuestro grupo trabaja en proyectos coordinados desde hace años, y han sido incluidos a lo largo de los diferentes capítulos de resultados de este trabajo en forma de figuras suplementarias.

Capítulo 3.1.

PROGRESIÓN DE LA PATOLOGÍA NEUROFIBRILAR EN EL HIPOCAMPO Y GIRO PARAHIPOCAMPAL DE MUESTRAS HUMANAS

Como estudio inicial se ha realizado un análisis detallado de la patología de tau en el hipocampo y giro parahipocampal de cada una de las muestras humanas disponibles. Una de las principales marcas histopatológicas de la enfermedad de Alzheimer es el desarrollo de lesiones neurofibrilares como consecuencia de la hiperfosforilación de tau y su posterior agregación en filamentos helicoidales pareados (PHFs), y consisten en la formación de 1) ovillos neurofibrilares (NFTs; del inglés *neurofibrillary tangles*) en los cuerpos neuronales, 2) filamentos en el neuropilo (NTs; del inglés *neuropil threads*) en las prolongaciones neuronales, y 3) neuritas distróficas asociadas a las placas. Dichas lesiones neurofibrilares se distribuyen siguiendo un patrón espaciotemporal determinado durante el curso de la enfermedad, lo que permite la identificación de seis estadios que se denominan desde Braak I, el estadio más inicial, hasta Braak VI, el estadio más avanzado. A diferencia de lo que ocurre con la acumulación de A β extracelular, la densidad de NFTs en regiones específicas del cerebro puede correlacionarse con el grado de demencia de los pacientes (Arriagada et al. 1992). Es por ello que el sistema de Braak (entre otros) viene siendo empleado, desde 1991, como criterio de diagnóstico neuropatológico *post mortem* de la enfermedad de Alzheimer (Braak y Braak 1991). Las muestras humanas de hipocampo y giro parahipocampal analizadas en el presente estudio fueron previamente clasificadas por los Biobancos de tejidos donantes (ver sección Material y Métodos) en Braak II (individuos en estadios iniciales asintomáticos), Braak III-IV (individuos en estadios moderados, con posible Alzheimer prodrómico) y Braak V-VI (individuos dementes, con enfermedad de Alzheimer). En este capítulo de resultados hemos analizado en todas las muestras de estos individuos la expresión de la proteína tau en diferentes estadios de fosforilación y agregación, mediante inmunohistoquímica y Western blots utilizando anticuerpos específicos (AT8 y AT100), en regiones altamente vulnerables y de gran importancia en los procesos de memoria, como son el hipocampo y la corteza perirrinal, esta última como representación del giro parahipocampal.

El anticuerpo AT8 es un marcador específico de la proteína tau fosforilada en los residuos de Ser199/202 y Thr205 situados en el extremo N-terminal. Dicho anticuerpo fue empleado para el estudio inmunohistoquímico cualitativo de la expresión de fosfo-tau en el hipocampo y giro parahipocampal de muestras *post mortem* de individuos Braak II, Braak III, Braak IV y Braak V-VI (Fig. 3.1.1). Las muestras analizadas de pacientes en estadio leve Braak II presentaron cambios neurofibrilares en forma de NFTs que afectaron de manera específica a las neuronas piramidales de CA1 y CA2 dentro del hipocampo (Fig. 3.1.1 A) y a las capas II y III de la corteza perirrinal y entorrinal (Fig. 3.1.1 E) dentro del giro parahipocampal.

En los individuos Braak III, estas lesiones se extendieron a las demás regiones del hipocampo, afectando también al *stratum oriens*, *stratum radiatum* y *stratum lacunosum-moleculare* de CA1 y CA2, proporcionando una apariencia bandeada en el hipocampo propio (Fig. 3.1.1 B). Además, regiones como el giro dentado y, en mayor medida el subículo, mostraron inmunotinción positiva

para AT8, pudiéndose diferenciar dichas estructuras dentro de la formación hipocampal. En cuanto al giro parahipocampal, la densidad de ovillos neurofibrilares, tanto en la corteza entorrinal (no mostrada) como en la corteza perirrinal, fue mayor a lo largo de las seis capas de la corteza, viéndose afectadas en mayor medida las capas III y V (Fig. 3.1.1 F).

Las muestras de individuos Braak IV mostraron un incremento sustancial de la inmunorreactividad para AT8 de manera generalizada en el hipocampo y, especialmente, en el subículo, como puede apreciarse en la figura 3.1.1 C. Además, la corteza perirrinal y la corteza entorrinal (no mostrada) presentaron cambios similares, exhibiendo un notable aumento de la inmunotinción para fosfo-tau en todo el neuropilo cortical, pudiéndose distinguir la capa granular interna o capa IV de la corteza en todo el giro parahipocampal (Fig. 3.1.1 G).

Finalmente, los individuos dementes Braak V-VI manifestaron una extensa patología neurofibrilar por todas las regiones de la formación hipocampal (Fig. 3.1.1 D) y por todo el conjunto cortical del giro parahipocampal (Fig. 3.1.1 H), con desarrollo de ovillos neurofibrilares a nivel intracelular y neuritas distróficas y NTs en los procesos dendríticos y axonales.

Después de analizar la progresión de los cambios neurofibrilares a nivel general en el hipocampo y giro parahipocampal, se caracterizaron en detalle, mediante inmunotinción con AT8, una a una las regiones del giro dentado, CA1, CA2 y subículo de la formación hipocampal, y corteza perirrinal como representación del giro parahipocampal, a lo largo de los estadios de Braak. El giro dentado de las muestras humanas analizadas fue la región del hipocampo que se afectó de forma más tardía. Como puede verse en la figura 3.1.2 (A1), el inmunomarcaje con AT8 en las muestras de estadios iniciales Braak II se limitó a un escaso número de células musgosas en la región del hilio. Estas neuronas, que acumularon fosfo-tau tanto en el soma como en las porciones proximales de las dendritas, se encontraban la mayoría en un estado de *pre-tangle* al no desarrollar ovillos neurofibrilares y permanecer con una morfología aparentemente normal, con el núcleo visible (Fig. 3.1.2 A2 y A4); otras neuronas sin embargo, agregaron tau y evolucionaron hacia NFTs (Fig. 3.1.2 A3). En las imágenes de detalle A2, A4 y A5 de la figura 3.1.2 se observan las enormes espinas dendríticas que caracterizan a estas neuronas hiliares/CA3, también afectadas por la acumulación de tau hiperfosforilado, en las que tienen lugar la sinapsis de los axones de las células granulares (fibras musgosas).

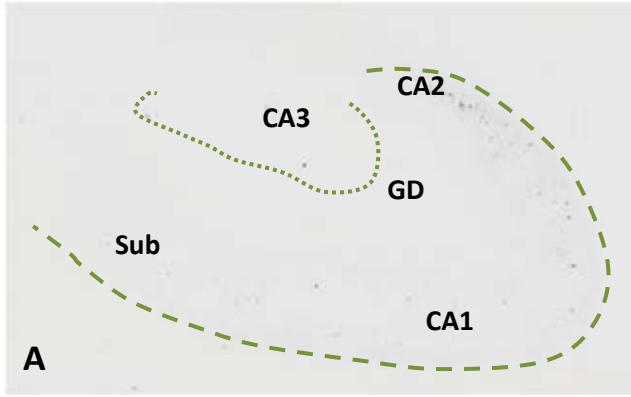
En las secciones de individuos Braak III aparecieron un mayor número de células musgosas inmunomarcadas en estado de *pre-tangle* (Fig. 3.1.2. B1). Además, la capa molecular se tornó inmunorreactiva, comenzando así los primeros cambios neurofibrilares en el giro dentado fuera de la capa polimórfica o hilio (Fig. 3.1.2. B1). También, se observaron *neuropil threads* (Fig. 3.1.2 B5) y las primeras neuritas distróficas AT8-positivas (Fig. 3.1.2 B3).

Los cambios neurofibrilares se hicieron más notables en el giro dentado de los individuos Braak IV en comparación con los estadios anteriores (Fig. 3.1.3 A1). Incrementó notablemente el número de neuronas hiliares/CA3 afectadas por la patología de tau (Fig. 3.1.3 A2 y A4) así como la cantidad de neuritas distróficas asociadas a las placas (Fig. 3.1.3 A3), la mayoría de ellas dispuestas de manera ordenada y seriada en la capa molecular, y de NTs (Fig. 3.1.3 A5).

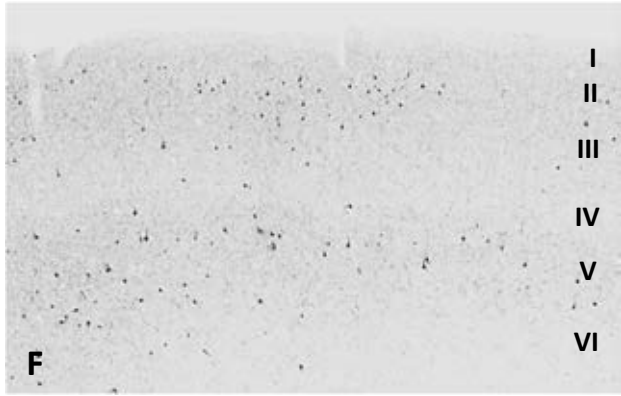
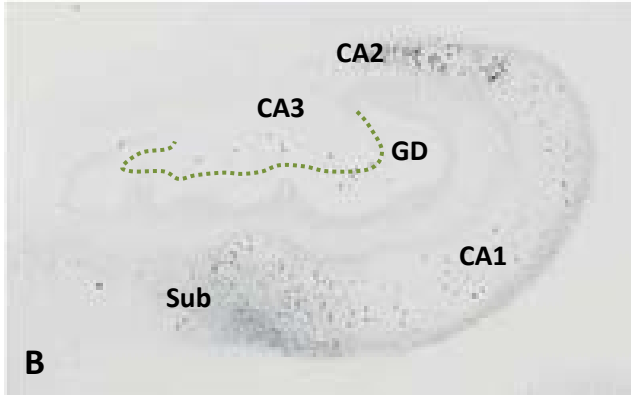
Hipocampo

Giro parahipocampal

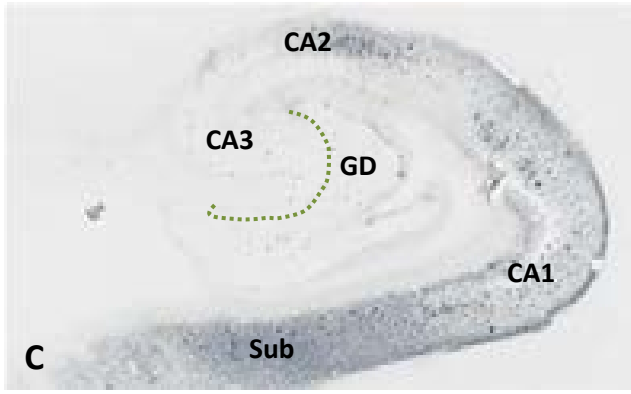
Braak II



Braak III



Braak IV



Braak V-VI

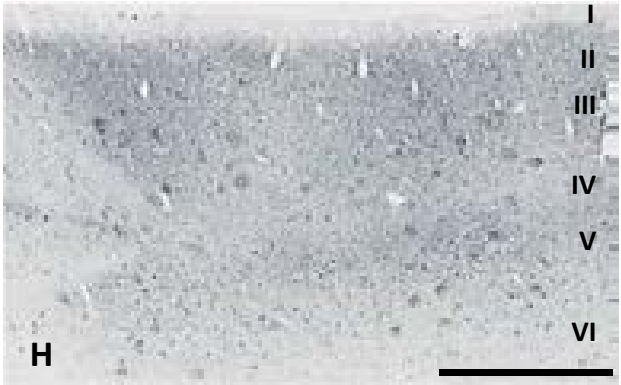
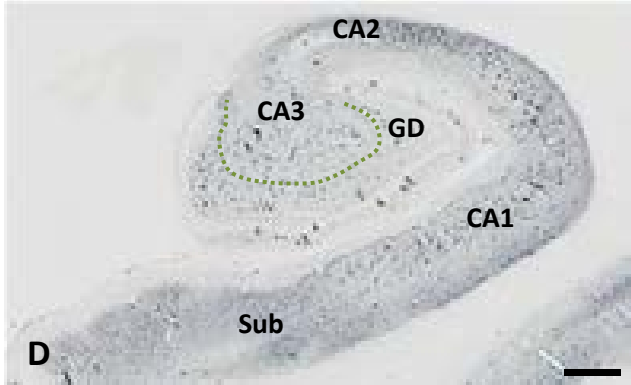


Figura 3.1.1 Progresión de la patología neurofibrilar en las muestras humanas clasificadas según los estadios de Braak. Inmunohistoquímica para AT8 en el hipocampo (A-D) y giro parahipocampal (GPH) (E-H). El área CA1/CA2 del hipocampo (A) y las capas II-III de la corteza perirrinal del GPH (E) son las primeras regiones en desarrollar ovillos neurofibrilares o NFTs . La patología de tau se extiende hacia el subículo (B) y la capa V del GPH (F) en los individuos Braak III y progresa hasta alcanzar el giro dentado (GD) y todo el espesor cortical (G) en Braak IV. Finalmente, los individuos dementes Braak V-VI presentan una intensa inmunoreactividad para fosfo-tau que afecta a todas las regiones de la formación hipocampal (D) y a la totalidad del GPH. *CA: asta de Amón; GD: giro dentado; Sub: subículo.* Barra de escala: 1 mm.

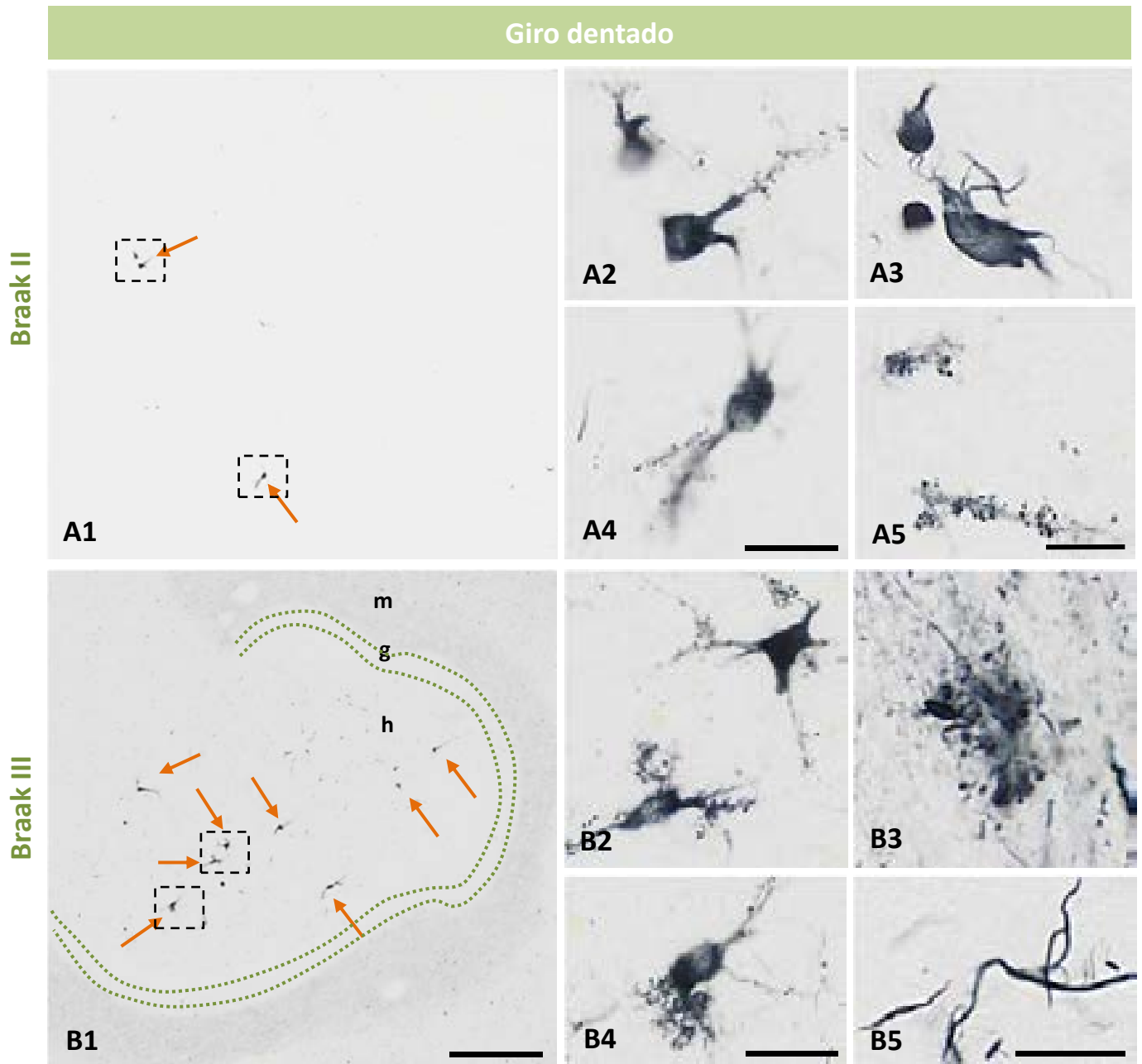


Figura 3.1.2. Afectación de la patología neurofibrilar en el giro dentado de individuos en estadios tempranos de la enfermedad de Alzheimer. Inmunohistoquímica para AT8 en el GD del hipocampo de individuos Braak II (A) y Braak III (B). Las imágenes de detalle (A2-A4) muestran un escaso número de células musgosas inmunoteñidas en la región CA4/hilio, así como sus características excrecencias dendríticas (A5) en el GD de pacientes Braak II. En las secciones Braak III, un mayor número de éstas neuronas acumulan fosfo-tau (B1) en el soma y en las porciones proximales de los procesos neuríticos como puede apreciarse en las imágenes de detalle B2 y B4. Además, se comienza a observar las primeras neuritas distróficas (B3) y filamentos del neuropilo o *neuropil threads* (NTs) (B5). *m*: capa molecular; *g*: capa granular; *h*: capa polimórfica o hilio. Barra de escala: A1-B1: 500 μ m; A2, A4, B2 y B4: 50 μ m; A3, A5, B3 y B5: 25 μ m.

Finalmente, el giro dentado de los individuos dementes (Braak V-VI) desarrolló una extensa y grave patología neurofibrilar que afectó a todo el conjunto de la región, incluido el estrato granular (Fig. 3.1.3 B1). Una gran cantidad de *pre-tangles* (Fig. 3.1.3 B2), NFTs (Fig. 3.1.3 B4) y neuritas distróficas grandes (Fig. 3.1.3 B3 y B5) se marcaron con AT8 en el hilio/CA3 de los pacientes de Alzheimer.

Tras analizar la patología neurofibrilar en el giro dentado de cada uno de los pacientes dementes Braak V-VI, fue destacable que la cantidad de ovillos neurofibrilares intracelulares que se desarrollaron en el hilio, así como el grado de inmunorreactividad del neuropilo en el hilio y en la capa molecular, fluctuaba entre los diferentes casos estudiados (Fig. 3.1.4). Además, la acumulación de tau hiperfosforilado en las células de la capa granular del giro dentado presentó también diversos grados de afectación entre los individuos con Alzheimer (ver detalles A2-C2 de la figura 3.1.4).

Las siguientes regiones estudiadas fueron CA1 y CA2. Ambas regiones sufrieron notables cambios neurofibrilares desde estadios tempranos. El número de neuronas de la capa piramidal de CA1 y CA2 que desarrollaron ovillos neurofibrilares incrementó progresivamente desde Braak II a V-VI (Fig. 3.1.5). En la imagen A2 de la figura 3.1.5 se muestra la morfología de un típico ovillo neurofibrilar intracelular, formado por la acumulación y posterior agregación de la proteína tau hiperfosforilada en el soma y en la porción proximal de la dendrita apical. El inserto de la figura 3.1.5. (E) indica la apariencia *pre-tangle* que presentaron la mayor parte de las neuronas principales de la región CA2 afectadas por la patología, con una fuerte tinción AT8-positiva perinuclear.

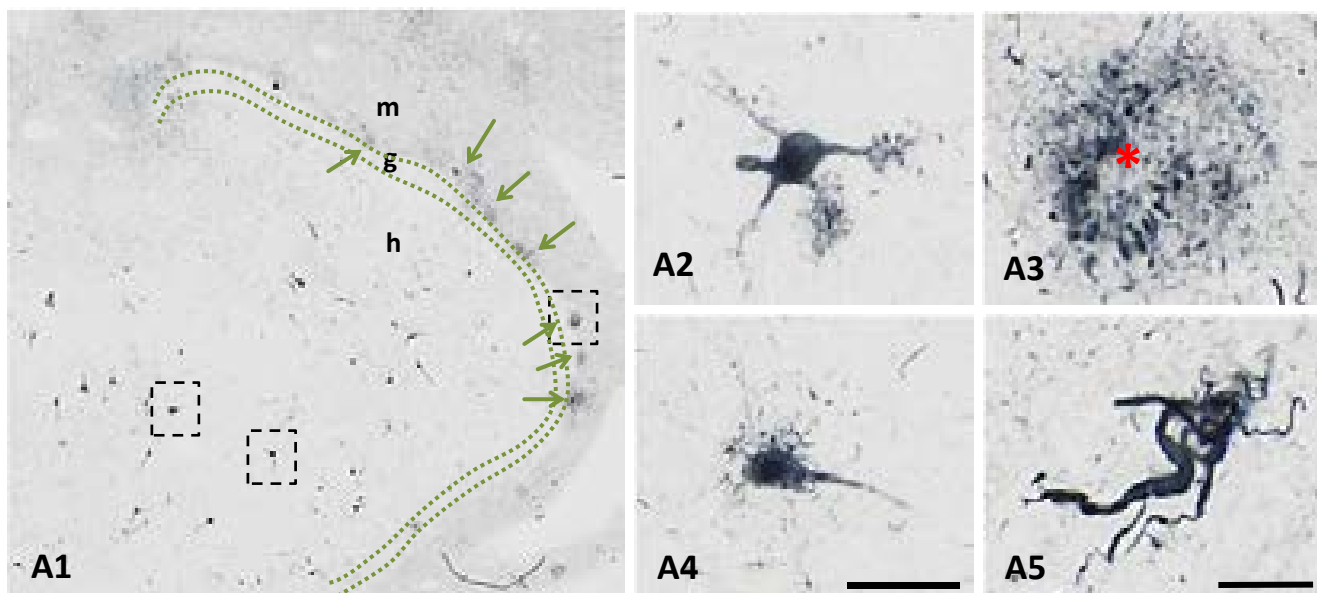
Las primeras neuritas distróficas de CA1 con fosfo-tau, así como NTs, se observaron en los individuos Braak III (Fig. 3.1.5. B1, detalle en B2), que mostraron también un aumento en la cantidad de NFTs y *pre-tangles* en CA1 y CA2, respectivamente. En las muestras Braak IV, todo el conjunto laminar de CA1 y CA2 apareció intensamente marcado (Fig. 3.1.5. C y G, respectivamente), a nivel celular en forma de NFTs (ver detalle en Fig. 3.1.5. C2) y a nivel neurítico, especialmente en la región CA2, en la que el estrato piramidal es más estrecho y empaquetado, en comparación con la extensa capa piramidal de CA1.

Por último, las regiones CA1 y CA2 de los pacientes de Alzheimer Braak V-VI presentaron un alto nivel de degeneración celular, comprometiendo tanto los somas (Fig. 3.1.5. D y H, respectivamente), como las prolongaciones dendríticas y axonales (ver inserto en la figura 3.1.5. H), desdibujando los límites entre las diferentes capas que componen las regiones CA1 y CA2.

El subículo es una región esencial en el flujo de información entre el hipocampo y la corteza entorrinal. Esta región hipocampal se encuentra bastante afectada por el proceso neurodegenerativo en nuestro modelo transgénico APP/PS1 desde edades tempranas (Trujillo-Estrada et al., 2014). Es por ello que también se quiso caracterizar la acumulación de fosfo-tau en el subículo de las muestras humanas a lo largo de la progresión de la enfermedad. Los primeros cambios neurofibrilares acontecidos en el subículo se limitaron a un escaso número de ovillos neurofibrilares en la capa piramidal en los individuos Braak II (Fig. 3.1.6. A1, detalle en A2). Las tres capas del subículo

Giro dentado

Braak IV



Braak V-VI

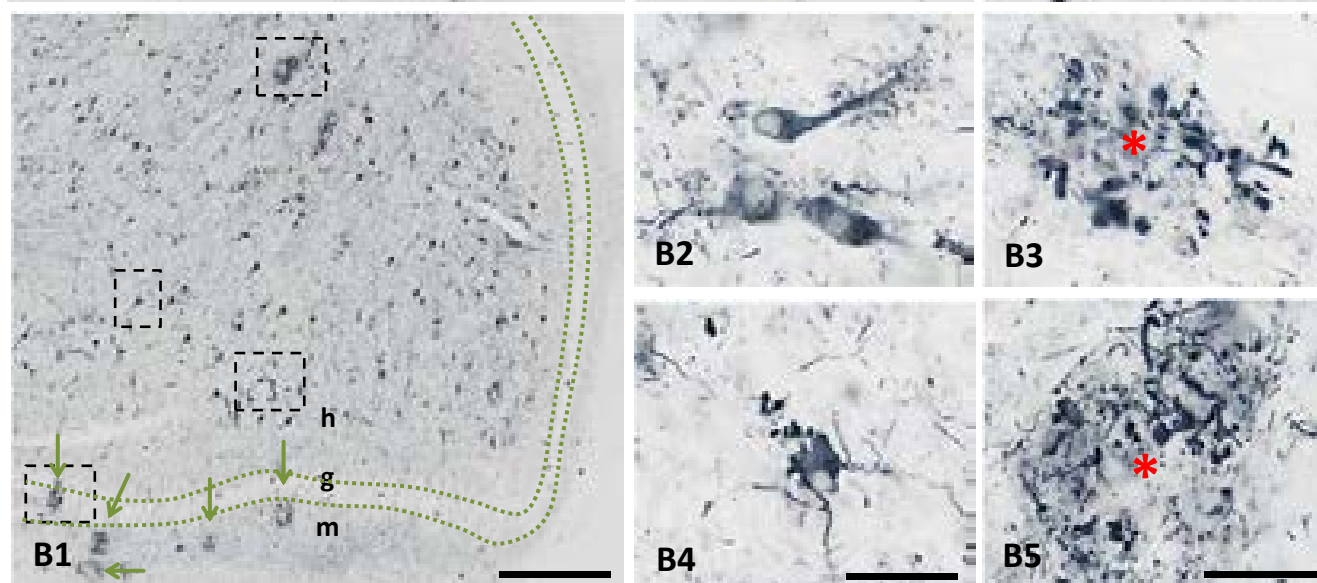


Figura 3.1.3. Afectación de la patología neurofibrilar en el giro dentado de individuos en estadios avanzados de la enfermedad de Alzheimer. Inmunohistoquímica para AT8 en el GD del hipocampo de individuos Braak IV (A) y Braak V-VI (B). Una gran cantidad de neuronas acumulan tau hiperfosforilado en la región CA4/hilio del GD de las muestras Braak IV (A1, detalles en A2 y A4); además, la capa molecular de los mismos individuos desarrolla cambios neurofibrilares en forma de neuritas distróficas (flechas) asociadas a las placas (A3, asterisco) y NTs (A5). El GD de los casos dementes Braak V-VI (B1) presenta una grave afectación de la patología de tau en forma de NFTs (B2), NTs (B4) y neuritas distróficas (B3 y B5) que se extiende por todas las capas, incluido el estrato granular. *m*: capa molecular; *g*: capa granular; *h*: capa polimórfica o hilio; * centro de placa de A β . Barra de escala: A1-B1: 500 μm; A2, A4, B2 y B4: 50 μm; A3, A5, B3 y B5: 25 μm.

Braak V-VI

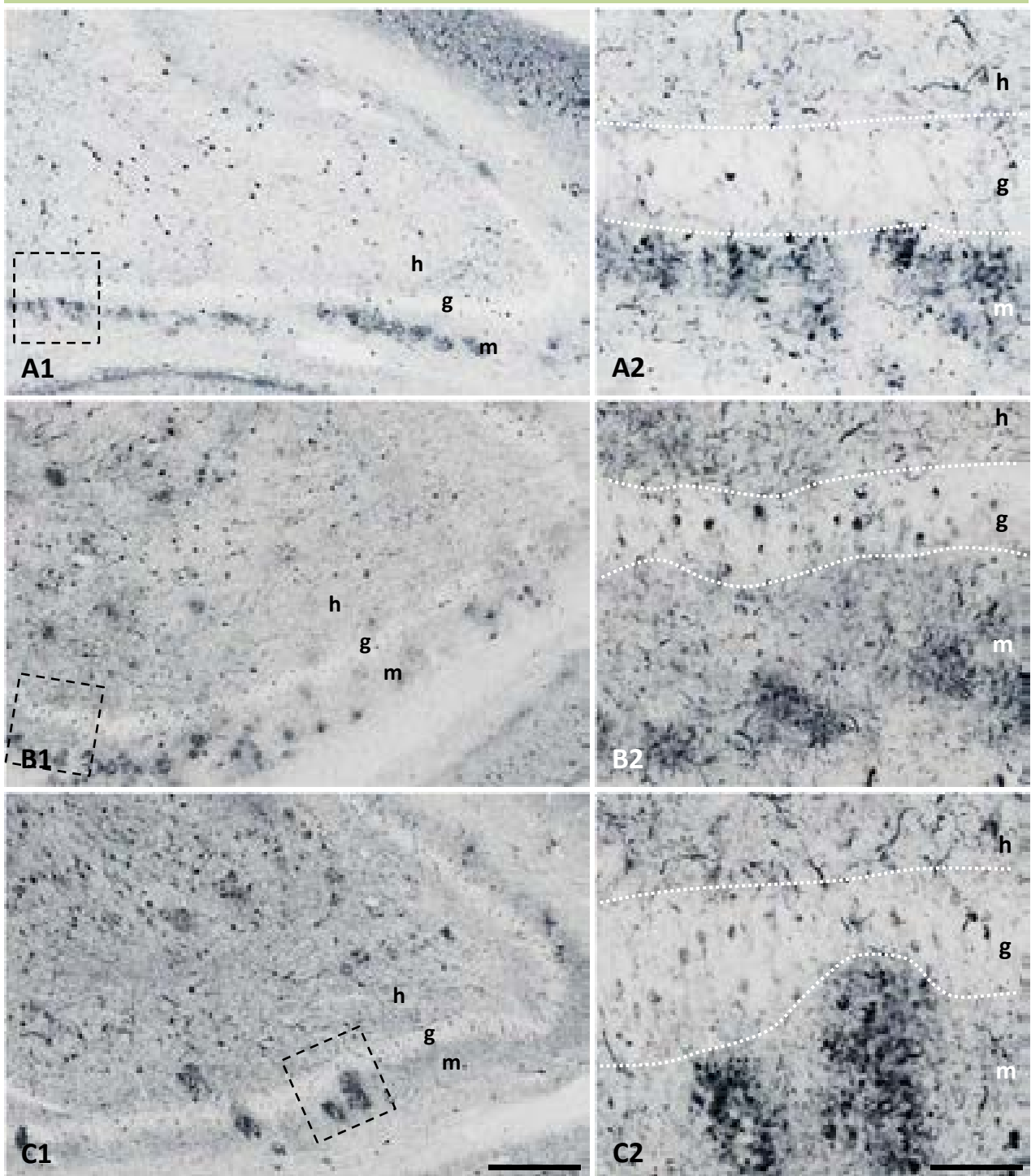


Figura 3.1.4. Variabilidad en el grado de afectación de la patología de tau en individuos de un mismo estadio Braak. Inmunohistoquímica para AT8 en el GD de tres individuos dementes Braak V-VI (A-C). La cantidad de ovillos neurofibrilares intracelulares que se desarrollan en el hilio, así como la intensidad en el marcaje de los plexos neuríticos en el hilio y en la capa molecular, varía entre los diferentes casos analizados Braak V-VI (A1-C1). Además, la acumulación de fosfo-tau en las células granulares del GD también presenta diferentes grados de afectación entre los casos más severos de la enfermedad. *m: capa molecular; g: capa granular; h: capa polimórfica o hilio; * centro de placa de A β .* Barra de escala: A1-C1: 500 μ m; A2-C2: 100 μ m.

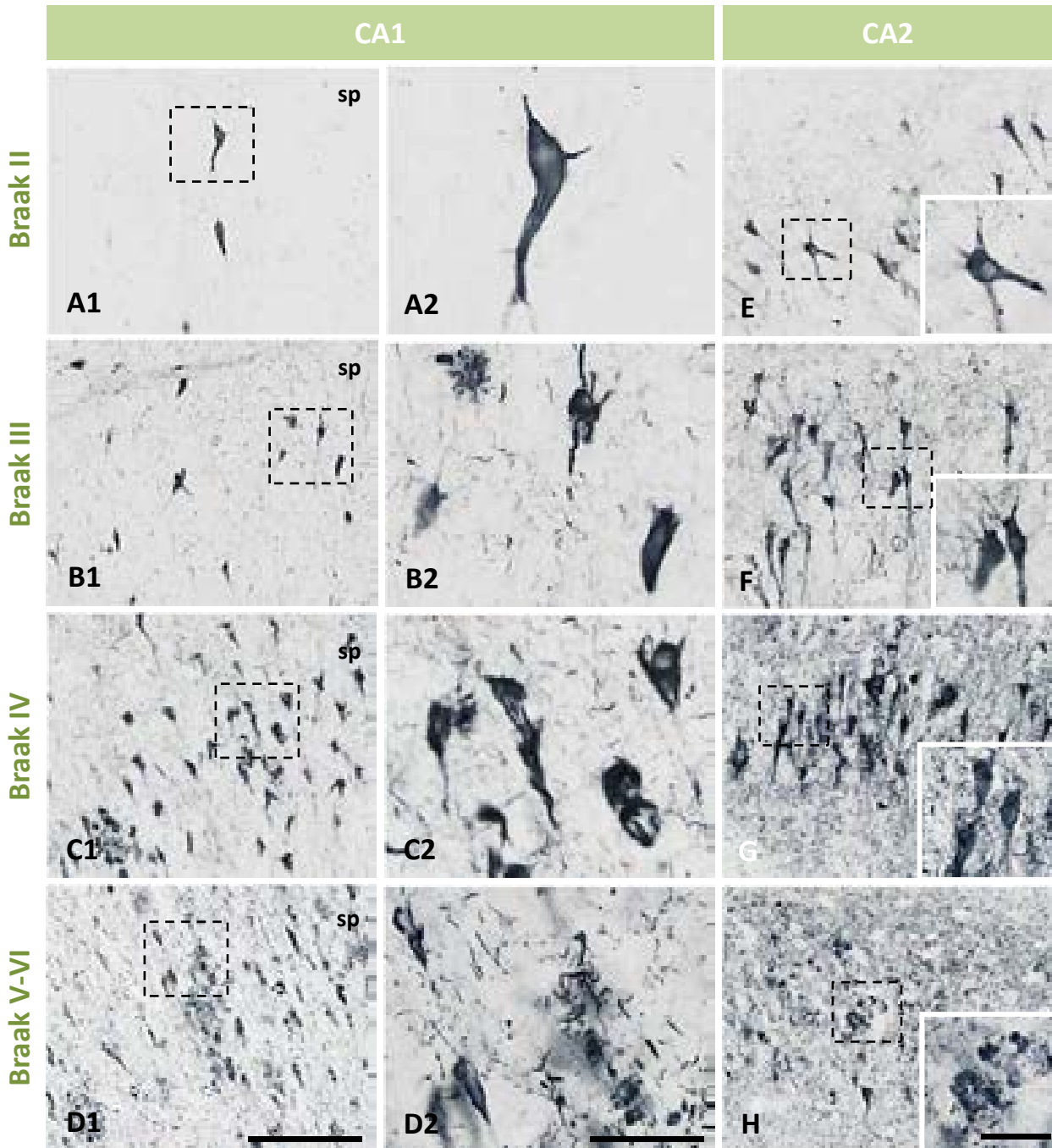


Figura 3.1.5. Cambios neurofibrilares en las regiones CA1/CA2 durante el curso de la enfermedad de Alzheimer. Inmunohistoquímica para AT8 en CA1 (A-D) y CA2 (E-H) en individuos clasificados según los estadios de Braak. El número de neuronas principales de CA1 y CA2 afectadas por la acumulación de fosfo-tau (ovillos neurofibrilares o NFTs) incrementa progresivamente desde los estadios tempranos Braak II (A y E, respectivamente) y Braak III (B y F, respectivamente), hasta etapas más tardías de la enfermedad (Braak IV, C y G, respectivamente; y Braak V-VI, D y H, respectivamente). Las primeras neuritas distróficas de CA1 positivas para AT8, así como NTs, se observan desde estadios tempranos Braak III (B1 y detalle en B2). Todo el conjunto laminar de CA1 y CA2 aparece extensamente inmunomarcado, comprometiendo tanto somas (C2, D2, insertos en G y H) como procesos neuríticos (D2, inserto en H) en los estadios avanzados Braak IV (C y G, respectivamente) y Braak V-VI (D y H, respectivamente). *sp*: *stratum pyramidale*. Barra de escala: A1-D1, E-H: 200 μ m; A2-D2, inserto en E-H: 50 μ m.

(polimórfica, piramidal y molecular) fueron distinguidas a partir de Braak III debido al incremento de la inmunorreactividad para AT8 en los cuerpos neuronales y en el neuropilo (Fig. 3.1.6. B1, detalle en B2). Como puede observarse en las figuras 3.1.6. C y D, a partir de Braak IV y Braak V-VI, respectivamente, el subículo de los casos más severos presentó una gran acumulación de la proteína tau hiperfosforilada, aumentando enormemente la inmunotinción para AT8 en todo el espesor subicular, imposibilitando el reconocimiento de las estructuras celulares debido al elevado grado de degeneración (ver detalles C2 y D2 de la figura 3.1.6).

Para estudiar la acumulación de fosfo-tau en la corteza temporal, se eligió como representación del giro parahipocampal a la corteza perirrinal y entorrinal, regiones en las que se observan los primeros cambios neurofibrilares asociados a tau (Braak I, no mostrado) en todo el encéfalo. Las capas superficiales II-III de la corteza perirrinal y entorrinal (no mostrada) de los casos Braak II fueron las primeras en desarrollar ovillos neurofibrilares intracelulares y NTs en los procesos neuríticos (Fig. 3.1.7. A), mientras que las capas profundas (IV-VI) apenas se vieron comprometidas (Fig. 3.1.7 B). Las grandes neuronas piramidales de las capas II-III acumularon fosfo-tau en el cuerpo celular y en la dendrita apical en diferente grado de agregación (NFT intracelular, detalle A2 de la figura 3.1.7 y *pre-tangles*, como muestran los detalles A3 y A4 de la misma figura).

En los individuos Braak III, el marcaje AT8-positivo se extendió por toda la región cortical, afectando tanto a capas superficiales (Fig. 3.1.7 C) como profundas (Fig. 3.1.7 D). En las capas superficiales de la corteza perirrinal y entorrinal (no mostrado) de los individuos Braak III se contemplaron los primeros *ghost tangles* (o NFTs extracelulares) (ver detalle C2 de la figura 3.1.7), que se forman cuando muere la neurona y el material agregado intraneuronal se convierte en una estructura extracelular. También, se encontraron neuritas distróficas, aunque de manera escasa (Fig. 3.1.7 D2).

A partir del estadio Braak IV, se acumuló una gran cantidad de tau hiperfosforilado en el interior de los somas de las neuronas principales de la corteza perirrinal y entorrinal (no mostrado) en forma de NFTs intracelulares y extracelulares en las capas II-III (Fig. 3.1.8 A1, detalle en A2) y en las capas profundas V-VI (Fig. 3.1.8 B1). También, se observó una intensa inmunotinción del neuropilo, con formación de *neuropil threads* y neuritas distróficas asociadas a las placas de Abeta (ver detalle B2 de la figura 3.1.8). Además, fue posible, aunque de forma ocasional, encontrar interneuronas de tipo Cajal-Retzius AT8-positivas en la capa I de la corteza (ver inserto en la figura 3.1.8 C).

La corteza perirrinal de los pacientes dementes Braak V-VI desarrolló una fuerte inmunorreactividad para fosfo-tau por todo su espesor (Fig. 3.1.8 D1 y E1). Por último, la mayoría de los ovillos neurofibrilares de las capas superficiales se localizaron a nivel extracelular (Fig. 3.1.8 D2), y las capas más profundas de la corteza perirrinal exhibieron áreas inmunonegativas (que se corresponden con placas de β -amiloide) rodeadas de numerosas neuritas distróficas ricas en fosfo-tau (ver detalle E2 de la figura 3.1.8).

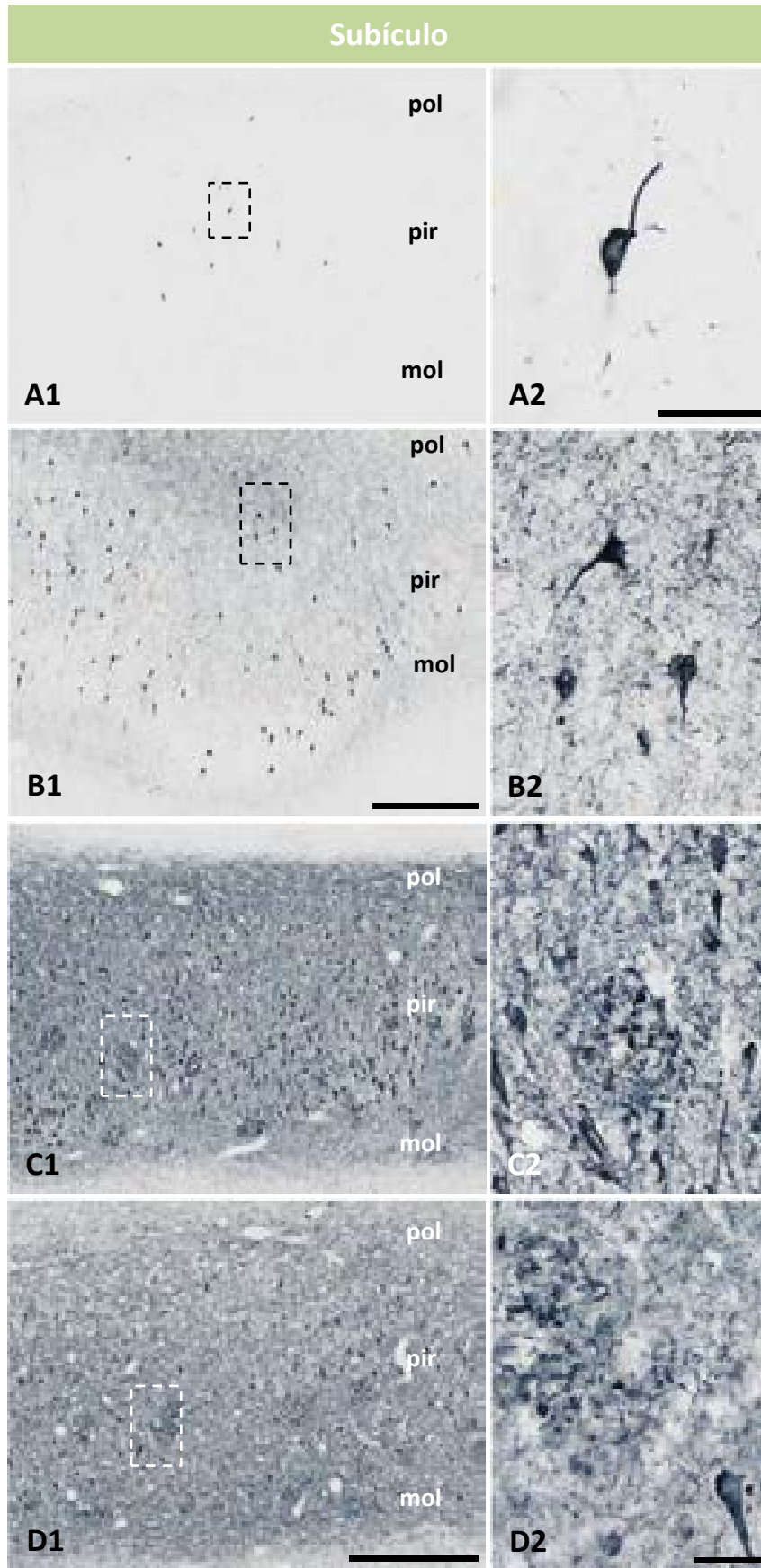


Figura 3.1.6. El subículo se encuentra gravemente afectado por la progresión de la patología neurofibrilar. Inmunohistoquímica para AT8 en el subículo de individuos clasificados según los estadios de Braak (A-D). En la capa piramidal de las muestras Braak II pueden observarse los primeros NFTs (A1, detalle en A2). A partir de Braak III todas las capas sufren cambios neurofibrilares (B1), incrementando el número de neuronas y neuritas que acumulan fosfo-tau (ver detalle en B2). El subículo de los casos más severos presenta una gran acumulación de la proteína tau hiperfosforilada (C1 y D1), incrementando enormemente la inmunorreactividad del neuropilo para el anticuerpo AT8 (C2 y D2). Barra de escala: A1-D1: 500 μm ; A2-D2: 50 μm .

Giro parahipocampal

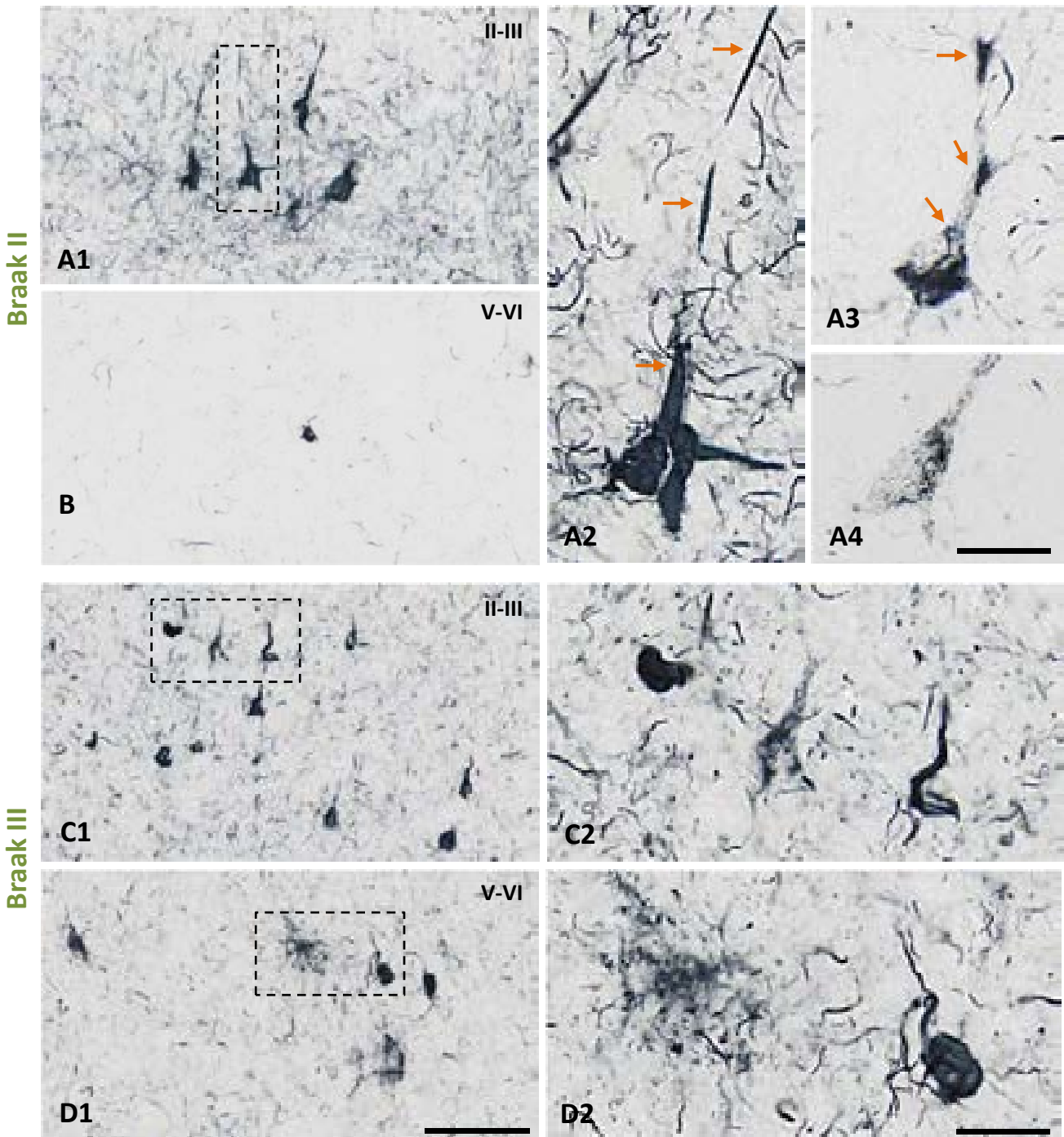


Figura 3.1.7. Progresión de los cambios neurofibrilares en el giro parahipocampal de muestras humanas en las etapas iniciales de la enfermedad. Inmunohistoquímica para AT8 en la corteza perirrinal del giro parahipocampal de pacientes en estadios Braak II (A y B) y Braak III (C y D). Las capas superficiales II-III son las primeras en desarrollar NFTs (A1), mientras que las profundas apenas se ven afectadas (B). En los casos Braak III, el marcaje AT8-positivo se extiende por toda la laminación cortical (C1 y D1), afectando tanto a los somas neuronales como al plexo neurítico. Ejemplos de ovillos intracelulares (NFTs) en distintos estadios de agregación de tau pueden observarse en los detalles ampliados A2, A3 y A4 (flechas indican dendrita apical). Los detalles C2 y D2 muestran NFTs extracelulares (o *ghost tangles*) y neuritas distróficas con fosfo-tau, respectivamente. Barra de escala: A1-D1, B: 100 μ m; A2-A4, C2 y D2: 25 μ m.

Giro parahipocampal

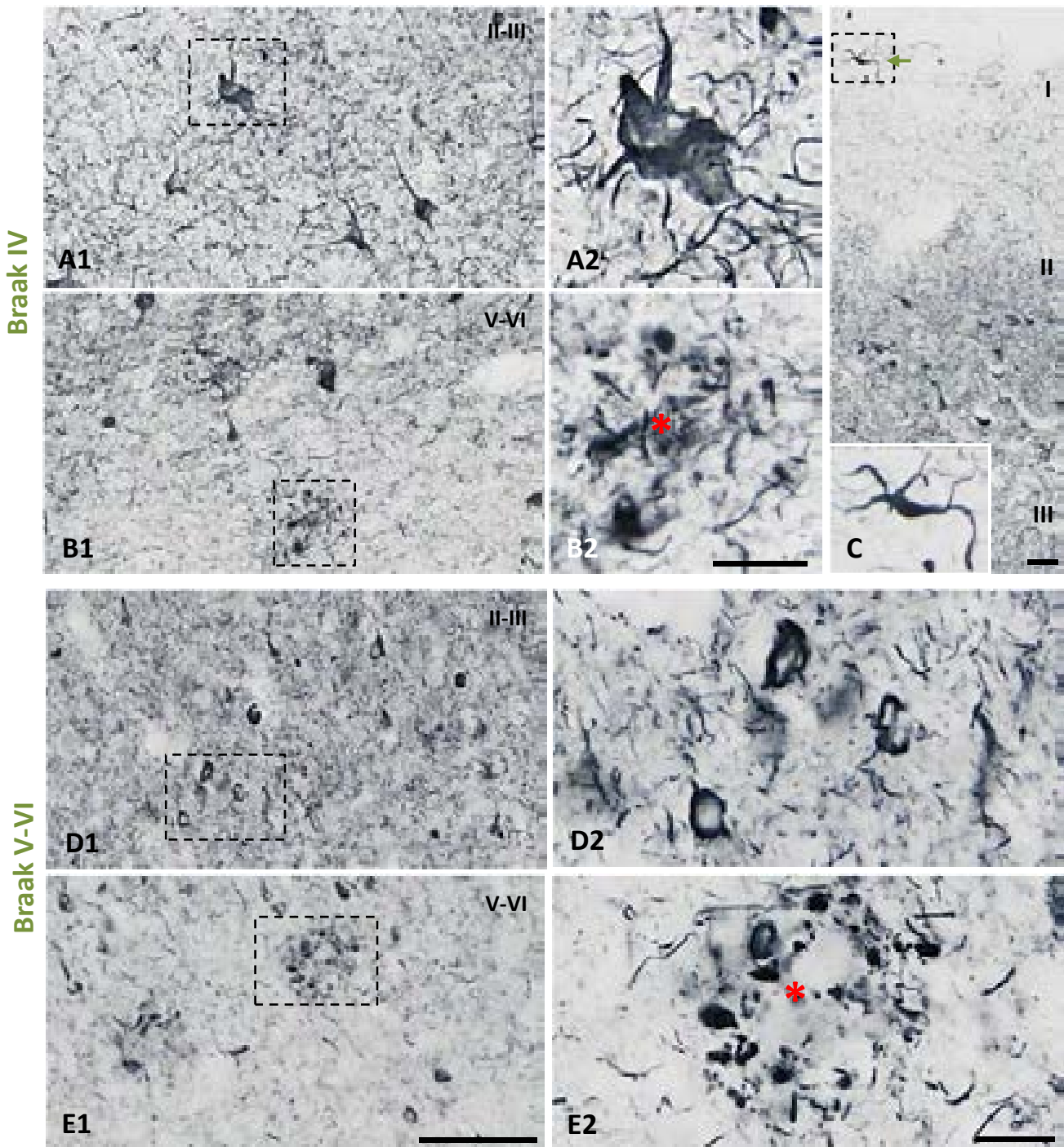


Figura 3.1.8. Progresión de los cambios neurofibrilares en el giro parahipocampal de muestras humanas en estadios avanzados de la enfermedad. Inmunohistoquímica para AT8 en la corteza perirrinal del giro parahipocampal de pacientes en estadios moderados Braak IV (A-B) y severos Braak V-VI (D y E). A partir del estadio Braak IV, una gran cantidad de fosfo-tau se acumula en el interior de los somas de neuronas principales, tanto en las capas superficiales (A1, detalle ampliado en A2) como en las profundas (B1); y en el interior de procesos axonales y dendríticos en forma de NTs y neuritas distróficas (ver detalle en B2, asterisco indica placa de A β). Pueden observarse también interneuronas de tipo Cajal Retzius AT8-positivas en la capa I de la corteza (ver inserto en C). La corteza perirrinal de los pacientes dementes Braak V-VI presenta una gran inmunorreactividad para fosfo-tau (D1 y E1) y la mayoría de los ovillos neurofibrilares se localizan a nivel extracelular (D2). El detalle ampliado E2 muestra una gran cantidad de neuritas distróficas AT8-positivas asociadas a una placa (E2; el asterisco indica la placa). Barra de escala: A1-E1: 100 μ m; A2, B2, C e inserto en C: 25 μ m; D2 y E2: 20 μ m.

Estos resultados revelan por un lado que las muestras *post mortem* analizadas presentan una correcta clasificación de Braak, y por otro que existe una extensa patología de fosfo-tau en todas las áreas analizadas, que progresa con un claro patrón espaciotemporal desde los estadios iniciales Braak II a los individuos dementes Braak V-VI.

A continuación, se realizó un estudio comparativo de los resultados inmunohistoquímicos obtenidos con el anticuerpo AT8 con otro marcador de residuos fosforilados en tau, para una mejor caracterización de la patología neurofibrilar. En concreto, empleamos el anticuerpo AT100 que reconoce la secuencia de fosforilaciones en los residuos de Ser19, Ser202, Thr205, Thr212 y Ser214 de la proteína tau, y que ocurren de forma posterior en el tiempo a las que reconoce el marcador AT8.

Como puede observarse, el hipocampo de los individuos Braak IV y Braak V-VI (Fig. 3.1.9 A y B, respectivamente) presentó una mayor inmunorreactividad con AT8 en todas las regiones en comparación con la obtenida con el anticuerpo AT100 (Fig. 3.1.9 C y D).

En cuanto al giro parahipocampal, el estudio inmunohistoquímico comparativo reveló que el anticuerpo AT8 reconoció también una mayor cantidad de fosfo-tau acumulado en los plexos axonales y dendríticos de la corteza perirrinal de los individuos Braak IV y dementes Braak V-VI (Fig. 3.1.10 A y B, respectivamente) en comparación con AT100 (Fig. 3.1.10 C y D, respectivamente). Las distrofias fosfo-tau-positivas presentaron una morfología similar con ambos marcadores, aunque resultaron más evidentes empleando el marcador AT8, en comparación con el anticuerpo AT100 (ver insertos en las figuras 3.1.10 A y C).

Comparando las diferentes regiones del hipocampo (giro dentado y CA1, Fig. 3.1.11 A1 y B1, respectivamente) y giro parahipocampal (corteza perirrinal, Fig. 3.1.11 C1) de enfermos de Alzheimer (Braak V-VI) inmunoteñidas con AT100, y pese a la menor inmunorreactividad obtenida con este marcador, la expresión de fosfo-tau fue similar a la estudiada con AT8. Es de destacar que los cambios neurofibrilares positivos para AT100, desarrollados en forma de NFTs intracelulares, *ghost tangles* y neuritas distróficas, resultaron más visibles o evidentes que con AT8 debido a la menor inmunotinción del neuropilo (ver detalles A2-C2, A3-C3 en la figura 3.1.11).

Por último, se analizó por *western blot* la expresión de las diferentes formas fosforiladas de tau, mediante los anticuerpos AT8 y AT100 (Figura suplementaria 3.1 A y B, respectivamente). Empleando las proteínas totales del hipocampo de individuos control e individuos Braak II, Braak III-IV y Braak V-VI, se demostró que las formas de tau monoméricas (con pesos moleculares entre 50-60 kDa) y oligoméricas fosforiladas (con pesos moleculares superiores a 60 kDa) detectadas con ambos anticuerpos monoclonales se acumularon preferentemente en los casos dementes Braak V-VI, en comparación con lo observado en los controles y en las muestras Braak III-IV de la misma edad. Además, se analizó también por *Western blot* la fracción de proteínas solubles (S1) del hipocampo de los mismos individuos, obteniéndose un aumento significativo en la acumulación de formas monoméricas fosforiladas de tau en los pacientes de Alzheimer tanto con el anticuerpo AT8 (Figura

suplementaria 3.2 A) como con el anticuerpo AT100 (Figura suplementaria 3.2 B). Estos monómeros de tau hiperfosforilado que se acumulan en la fracción soluble de los pacientes dementes podrían ser tóxicos para las células.

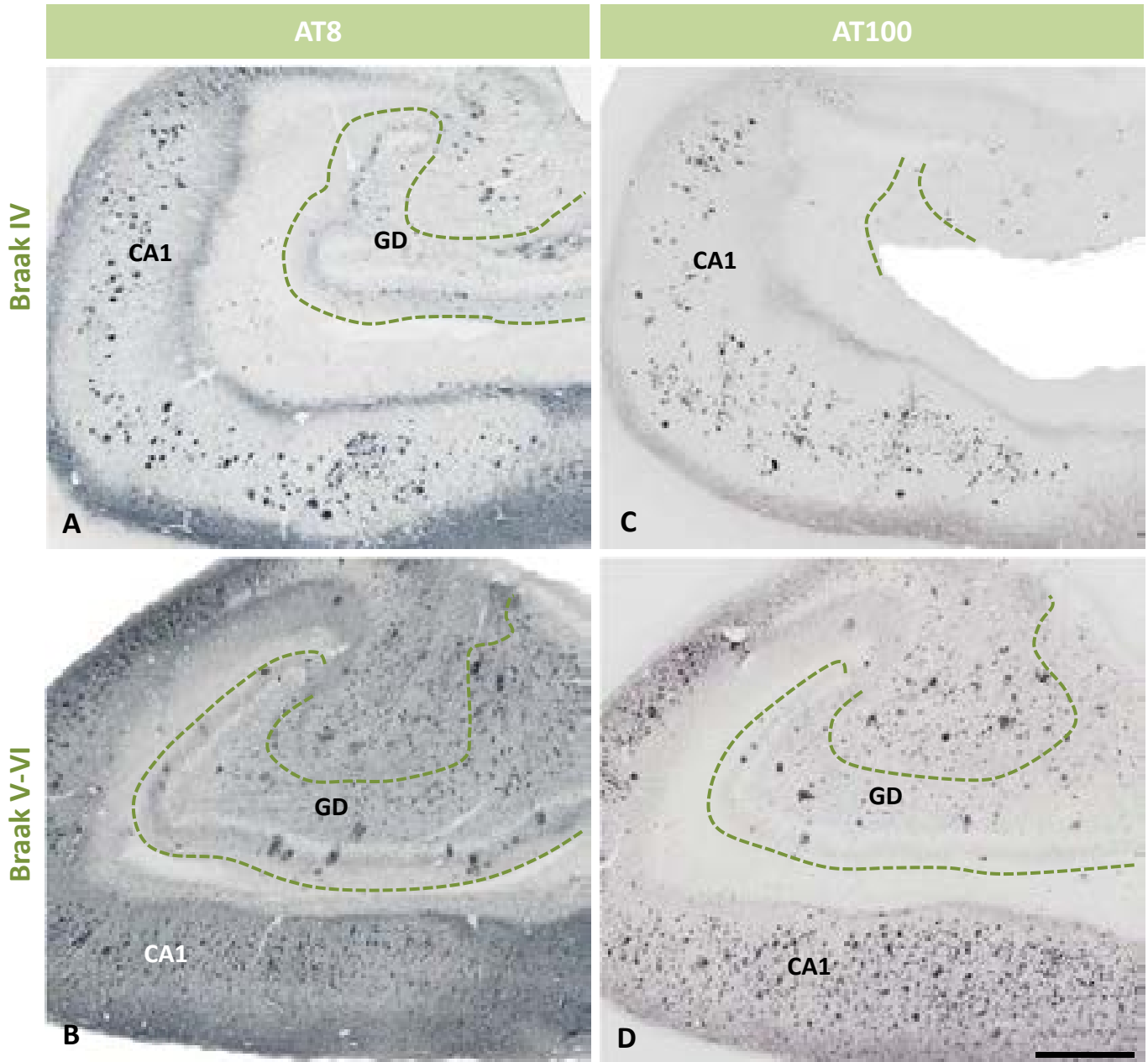


Figura 3.1.9. AT8 reconoce una mayor cantidad de fosfo-tau acumulado en el hipocampo de muestras humanas en comparación con AT100. Estudio inmunohistoquímico comparativo entre los marcadores de fosfo-tau AT8 (A y B) y AT100 (C y D) en el hipocampo de individuos Braak IV e individuos dementes Braak V-VI. El anticuerpo AT8, que reconoce una secuencia de fosforilación en tau más temprana que el anticuerpo AT100, proporciona una mayor inmunorreactividad para el estudio de la patología neurofibrilar. CA: *Asta de Amón*; GD: *giro dentado*. Barra de escala: 1 mm.

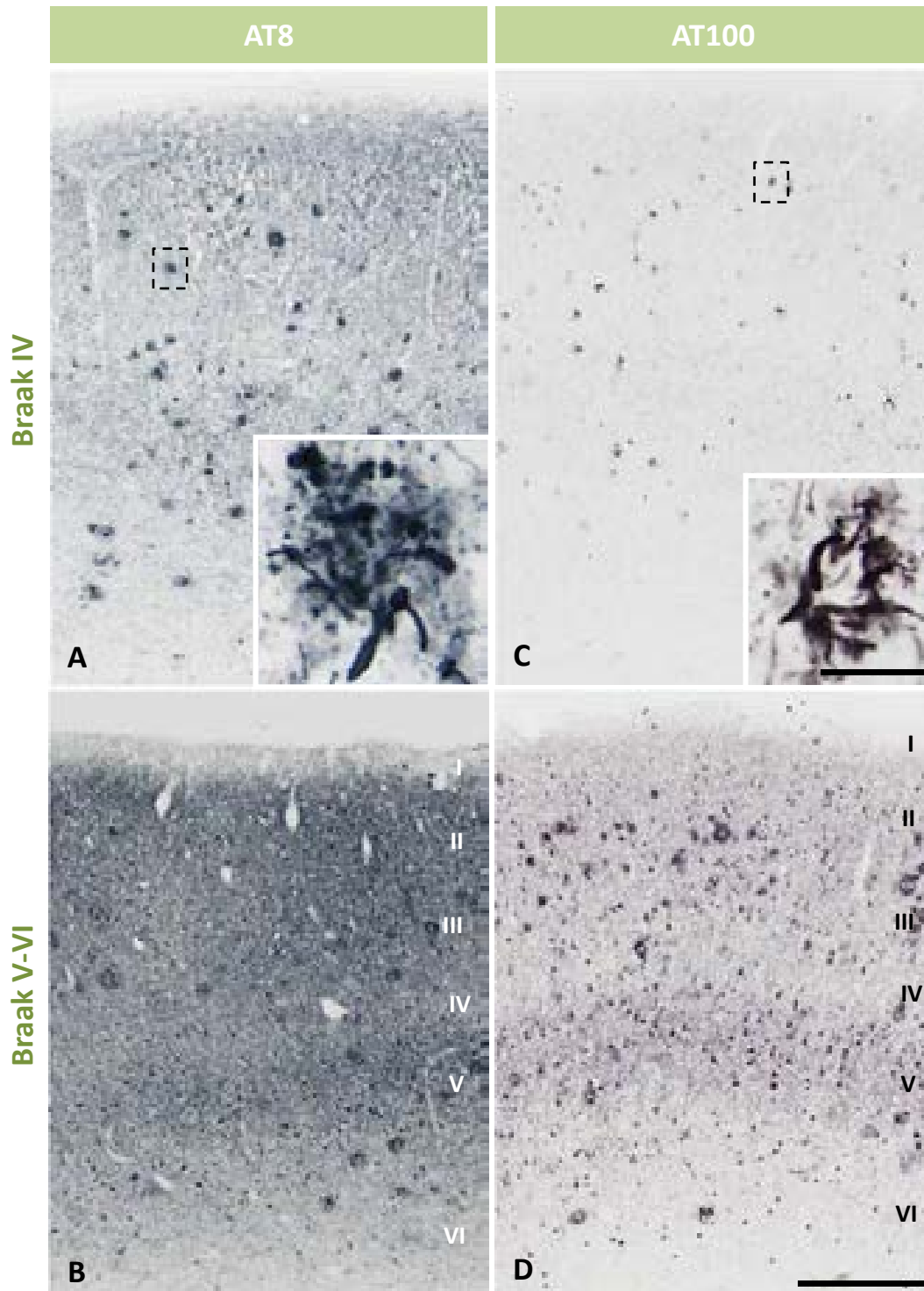


Figura 3.1.10. AT8 reconoce una mayor cantidad de fosfo-tau acumulado en el giro parahipocampal de muestras humanas en comparación con AT100. Estudio inmunohistoquímico comparativo entre los anticuerpos AT8 (A y B) y AT100 (C y D) en la corteza perirrinal del GPH de individuos Braak IV e individuos dementes Braak V-VI. Al igual que ocurre en el hipocampo, la inmunorreactividad observada con AT8 es mayor en comparación con AT100, el cual reconoce una secuencia de fosforilación en la proteína tau posterior. Los insertos en A y C muestran el detalle comparativo de neuritas distróficas positivas para AT8 y AT00, respectivamente. Barra de escala: A-D: 500 μ m; inserto en A y C: 20 μ m.

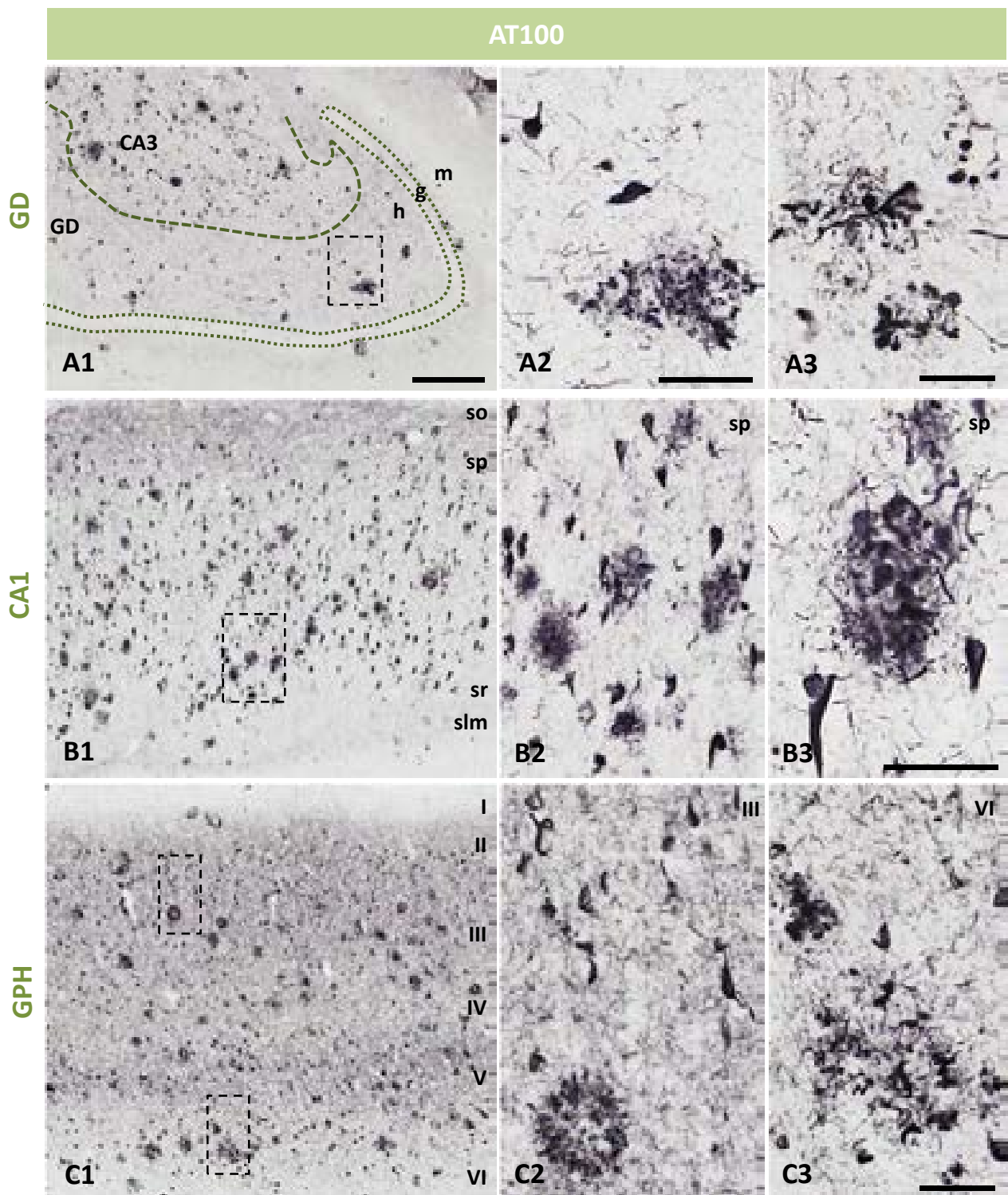


Figura 3.1.11. Inmunohistoquímica para AT100 en el giro dentado (A), CA1 (B) y giro parahipocampal (C) de pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Braak V-VI). Con el anticuerpo AT100 se marca un estadio de fosforilación de tau más tardío en comparación con el marcador AT8. La expresión de fosfo-tau con este marcador es similar a la observada con AT8, aunque al acumularse una menor densidad de esta forma hiperfosforilada en el neuropilo, la inmunotinción de los NFTs intracelulares, extracelulares (*ghost tangles*) y neuritas distróficas permite la observación más clara de estas estructuras (ver detalles en A2-C2, A3-C3). *GD*: giro dentado; *m*: capa molecular; *g*: capa granular; *h*: capa polimórfica o hilio; *CA*: Asta de Amón; *so*: stratum oriens; *sp*: stratum pyramidale; *sr*: stratum radiatum; *slm*: stratum lacunosum-moleculare. Barra de escala: A1-C1: 500 μ m; A2 y B2: 100 μ m; C2, A3-C3: 50 μ m.

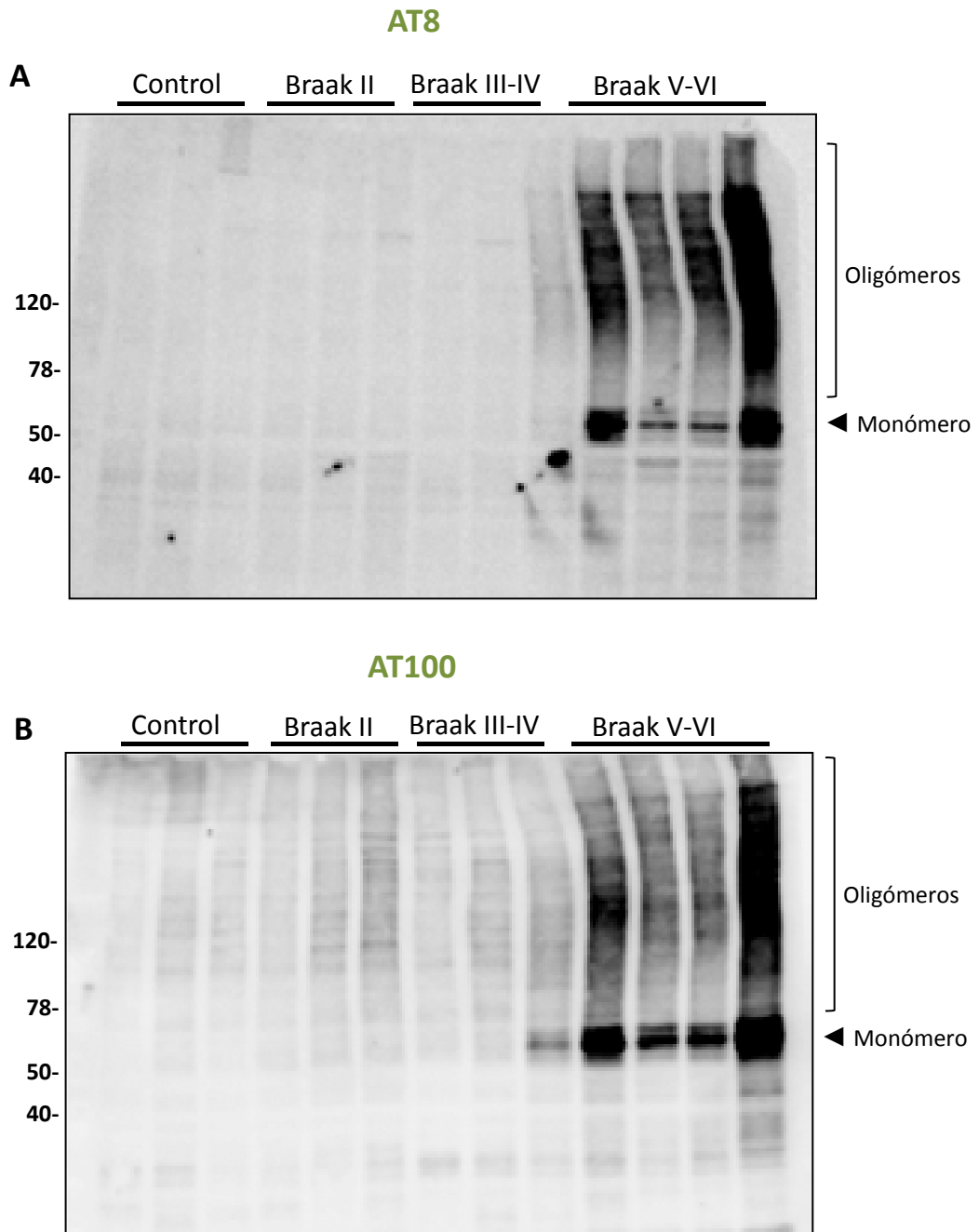


Figura Suplementaria 3.1. Acumulación de monómeros y oligómeros de fosfo-tau en el hipocampo de individuos dementes Braak V-VI. *Western blots* representativos con los anticuerpos AT8 (A) y AT100 (B) utilizando proteínas totales de hipocampo de individuos control, Braak II, Braak III-IV y Braak V-VI. Existe una evidente acumulación de formas monoméricas fosforiladas así como de oligómeros fosforilados en los individuos Braak V-VI con ambos anticuerpos para fosfo-tau usados. Resultados obtenidos en colaboración con el Dr. Javier Vitorica de la Universidad de Sevilla.

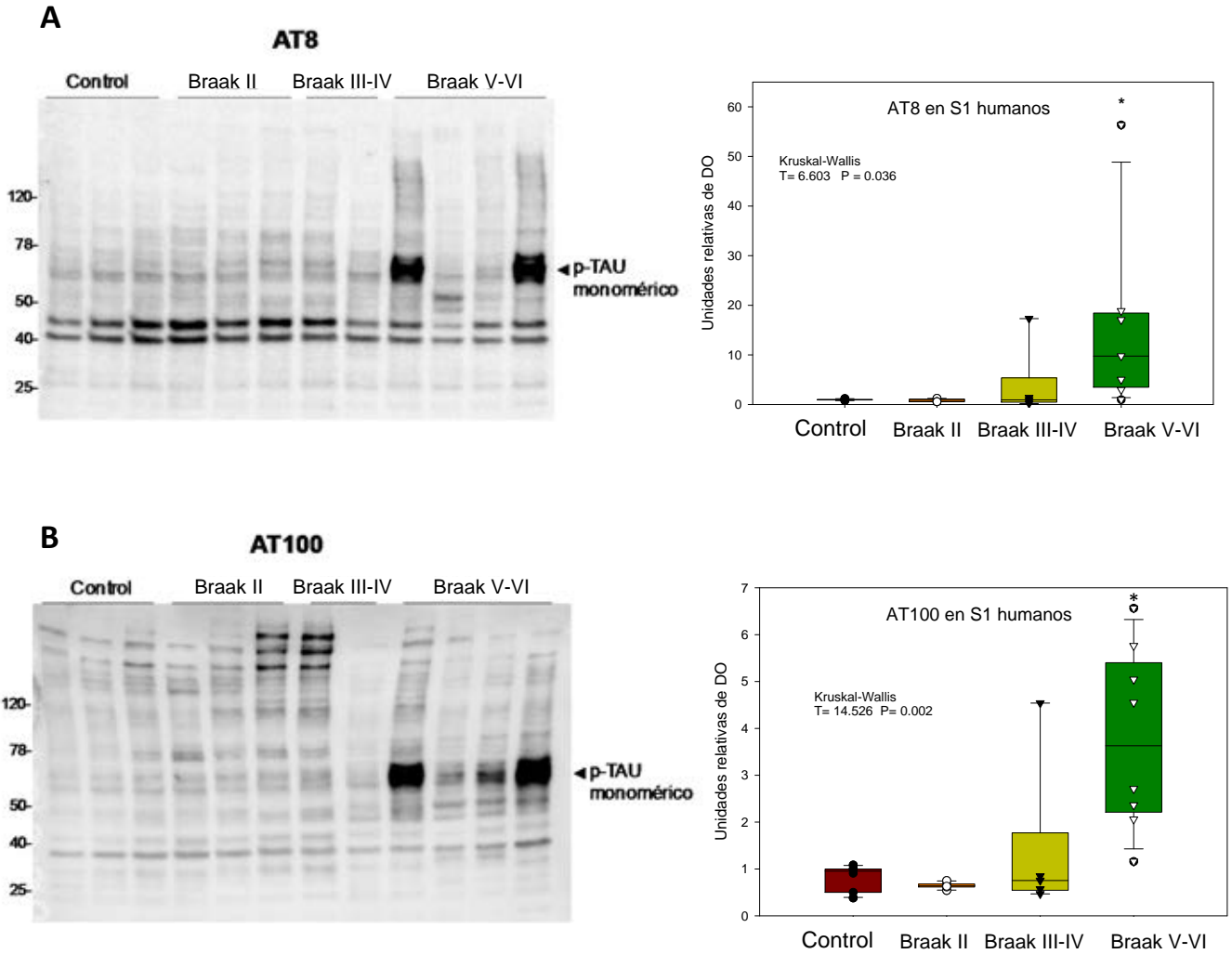


Figura Suplementaria 3.2. Aumento significativo de las formas monoméricas fosforiladas de tau en la fracción soluble del hipocampo de individuos dementes Braak V-VI. *Western blots* representativos con los anticuerpos AT8 (A) y AT100 (B) utilizando la fracción S1 (proteínas solubles) de hipocampo de individuos control, Braak II, Braak III-IV y Braak V-VI. Existe acumulación significativa de formas monoméricas fosforiladas de tau en los individuos Braak V-VI con ambos anticuerpos usados. Resultados obtenidos en colaboración con el Dr. Javier Vitorica de la Universidad de Sevilla.

Capítulo 3.2.

PROGRESIÓN DE LA PATOLOGÍA AMILOIDE EN EL HIPOCAMPO Y GIRO PARAHIPOCAMPAL DE MUESTRAS HUMANAS

Las placas seniles son, junto a los ovillos neurofibrilares, unas de las lesiones histopatológicas características de la enfermedad de Alzheimer y están formadas mayoritariamente por péptidos A β . Aunque no se ha demostrado una relación entre la carga amiloide cerebral y la pérdida de función cognitiva (Terry et al. 1991; Andrade-Moraes et al. 2013) es bien conocida la capacidad tóxica del A β y en especial de sus formas solubles oligoméricas (Brouillette et al. 2012; Benilova et al. 2012; Viola y Klein 2015). De hecho, los niveles de A β oligomérico soluble sí guardan una alta correlación con el deterioro cognitivo en la enfermedad de Alzheimer (Haass y Selkoe 2007; Tomic et al. 2009). El origen de estos oligómeros no es conocido, siendo las placas una posible fuente de estas formas tóxicas. La patología amiloide presenta una gran variabilidad entre los individuos que padecen Alzheimer en cuanto al tipo de placas que desarrollan y a su distribución espaciotemporal. Además, y de manera similar a como ocurre con los estadios de Braak para la patología de tau, se pueden distinguir varias fases temporales (entre 3 y 4 según los autores) para la patología amiloide según la distribución topográfica de los depósitos de A β (Thal et al. 2002, 2006; Montine et al. 2012).

Uno de los objetivos del presente trabajo ha sido analizar el patrón de distribución extracelular de diferentes formas de A β (A β ₁₋₄₂, A β oligomérico y A β fibrilar), así como los principales tipos de placas a los que dan lugar (fibrilares, de núcleo denso con halo no fibrilar, y difusas) en el hipocampo y giro parahipocampal de las mismas muestras humanas *post mortem* utilizadas para el estudio de la patología tau. También se ha estudiado la degeneración neurítica asociada al A β y su posible relación espacial con tipos específicos de placas. Por último, se ha analizado la angiopatía cerebral amiloide (CAA) asociada a la progresión de la enfermedad.

Además, se han comparado estos resultados con los obtenidos en las muestras de ratones transgénicos APP/PS1, un modelo que sobreexpresa el gen APP humano mutado y forma placas desde los 2-3 meses de edad en regiones como el hipocampo y la corteza entorrinal (Ramos et al. 2006; Jimenez et al. 2008; Moreno-Gonzalez et al. 2009; Baglietto-Vargas et al. 2010; Trujillo-Estrada et al. 2014).

3.2.1. Patrón de distribución espacio temporal de la patología amiloide

Para analizar el patrón de distribución espacial de los depósitos extracelulares de A β se realizó un estudio inmunohistoquímico con el anticuerpo OC, que reconoce formas oligoméricas que adquieren una conformación proteica fibrilar (Sarsoza et al. 2009), en el hipocampo y giro parahipocampal de muestras humanas en diferentes estadios Braak (leve o Braak II, moderado o Braak III-IV y severo o Braak V-VI). Los resultados obtenidos en este estudio inmunohistoquímico para el A β , así como aquellos derivados de la observación de neuritas distróficas APP-positivas o

AT8-positivas, en cada una de las muestras humanas *post mortem* analizadas, se resumen en la tabla 3.2.1.

Sujeto	Edad	Sexo	TPM	Braak	Demencia	Depósitos β -amiloide					
						HP			GPH		
						GD	CA1	S	PrS	CE	CP
Control 1	46	M	14 h 5 min	0	No	0-	0-	0-	0-	0-	0-
Control 2	58	H	3 h 10 min	0	No	0-	0-	0-	0-	--	0-
Control 3	72	M	6 h 10 min	0	No	0-	0-	0-	0-	--	0-
Caso 1	79	H	4 h 15 min	II	-	0-	0-	0-	0-	0-	0-
Caso 2	86	M	4 h 15 min	II	-	0-	0-	0-	0-	--	+++D
Caso 3	77	H	2 h 55 min	II	-	0-	0-	0-	+D	--	+C
Caso 4	83	M	3 h 25 min	II	-	0-	0-	0-	0-	--	0-
Caso 5	77	M	11 h	II	-	0-	+D	+D	++D	++D	++D
Caso 6	77	M	9 h 40 min	II	-	0-	0-	0-	0-	--	0-
Caso 7	86	M	5 h 35 min	II	-	0-	+B	+B	+++D	++B	++B
Caso 8	82	M	3 h 05 min	III	-	0-	0-	+D	++D	--	+++D
Caso 9	68	M	4 h 45 min	III	-	0-	0-	0-	0-	0-	0-
Caso 10	81	H	5 h 5 min	III	-	+C	+C	++C	+++D	--	+++B
Caso 11	77	M	10 h 15 min	III	-	+B	++A	++A	+++D	+++B	+++A
Caso 12	67	H	16 h 15 min	IV	-	++C	+++C	+++C	+++D	--	+++C
Caso 13	82	M	17 h 15 min	IV	-	+-	++-	++-	+++-	--	+++-
Caso 14	84	H	12 h 15 min	IV	-	+B	++C	++C	+++D	++B	+++B
Caso 15	56	M	7 h	V-VI	Sí	++C	+++C	++C	+++D	+++A	+++C
Caso 16	63	M	13 h 30 min	V-VI	Sí	+++C	++B	++C	+++D	++A	+++A
Caso 17	87	M	5 h 15 min	V-VI	Sí	+++C	+++C	+++C	--	--	+++C
Caso 18	77	M	16 h 30 min	V-VI	Sí	+C	++C	+++C	+++D	--	+++C
Caso 19	84	M	9 h	V-VI	Sí	--	--	--	--	--	--
Caso 20	75	M	7 h 45 min	V-VI	Sí	++C	++B	++B	+++D	--	+++A
Caso 21	76	H	6 h	V-VI	Sí	+-	+-	++-	+++-	--	+++-
Caso 22	93	H	5 h	V-VI	Sí	+C	++B	++B	+++D	--	+++A
Caso 23	82	H	5 h	V-VI	Sí	++C	++C	++C	--	+++B	+++C
Caso 24	85	H	4 h 30 min	V-VI	Sí	++C	+B	+B	++D	++A	+++A

Tabla 3.2.1. Relación de los casos humanos analizados en el presente estudio para la caracterización de la patología amiloide (sujetos control y sujetos con patología asociada a la enfermedad de Alzheimer) y los datos referentes a la edad, sexo, tiempo *post mortem*, clasificación de Braak, síntomas clínicos de demencia y neuropatología amiloide de las muestras. *TPM, intervalo de tiempo post mortem; Braak, clasificación en los estadios de Braak (0-VI), según la distribución topográfica de ovillos neurofibrilares; HP, hipocampo; GPH, giro parahipocampal; GD, giro dentado; CA, asta de Amón; S, subículo; PrS, presubículo; CE, corteza entorrinal; CP, corteza perirrinal; M, mujer; H, hombre.* Caracterización histopatológica de las placas de β -amiloide: 0, sin placas; +, escasos depósitos; ++, cantidad moderada de depósitos; +++, abundantes depósitos; A, una minoría de las placas son neuríticas (APP y AT8 positivas); B, la mitad de las placas son neuríticas; C, la mayoría de las placas son neuríticas; D, todas las placas son difusas y no neuríticas; -, no procede.

Pese a la gran variabilidad que presenta la formación de los depósitos amiloides en los individuos no dementes (Braak II y Braak III-IV en nuestras muestras) y los dementes (pacientes de Alzheimer, Braak V-VI), la mayoría de las muestras de estadio leve Braak II desarrollaron placas en el giro parahipocampal (corteza perirrinal, presubículo y corteza entorrinal, en este orden; ver tabla 3.2.1) (Fig. 3.2.1 A). La formación hipocampal de los casos Braak II en raras ocasiones se encontró afectada por la patología amiloide. Cuando esto sucedió, las regiones involucradas fueron el subículo y CA1 (en este orden, ver tabla 3.2.1) (Fig. 3.2.1 B).

Los individuos Braak III desarrollaron placas de $A\beta$ a lo largo de todo el giro parahipocampal (Fig. 3.2.2 A), con la única excepción de entre todas las muestras analizadas de un caso inmunonegativo para OC (ver tabla 3.2.1). Los casos en estadios intermedios Braak IV, acumularon depósitos de $A\beta$ también en la formación hipocampal, viéndose afectada en último lugar la capa molecular del giro dentado (Fig. 3.2.2 B) y siguiendo por tanto, un patrón de distribución determinado: CP, PrS, CE, S, CA1 y GD (en este orden, ver tabla 3.2.1).

Como se contempla en las imágenes panorámicas A y B de la figura 3.2.3, el hipocampo y el giro parahipocampal de los pacientes dementes Braak V-VI presentaron un claro patrón de distribución diferencial de los depósitos OC-positivos, permitiendo así la delimitación entre las diferentes regiones del lóbulo temporal. Absolutamente la totalidad de las muestras estudiadas de los pacientes de Alzheimer Braak V-VI exhibieron placas en el hipocampo, y como puede deducirse en la tabla 3.2.1, la capa polimórfica o hilio del giro dentado fue la última región de todas las estudiadas en verse afectada por la patología amiloide, siendo sólo positiva en los individuos Braak V-VI.

El estudio comparativo del anticuerpo OC con otros anticuerpos clásicos para $A\beta$ total como son el 6E10 o el 4G8 en secciones seriadas de un mismo individuo Braak V-VI reveló que el anticuerpo OC da lugar a una inmunorreactividad mayor en todas las regiones en comparación con 6E10 (no mostrado) o con 4G8 (Fig. 3.2.4 A y B; ver detalles A2 y B2). El anticuerpo OC es específico de conformación, detectando las formas oligoméricas consideradas las más tóxicas. Hasta la fecha, no se había realizado un estudio similar en muestras humanas con este anticuerpo.

Para poder comparar estos resultados en muestras humanas con nuestro modelo transgénico APP/PS1, se realizó un estudio inmunohistoquímico comparativo empleando de nuevo el anticuerpo OC en ratones APP/PS1 de 4, 6, 12 y 18 meses de edad (Fig. 3.2.5 A-D). A diferencia de lo

Resultados

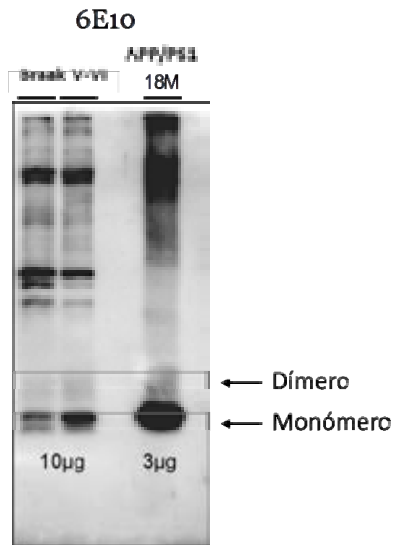


Figura suplementaria 3.3. *Western blot* de hipocampo de individuos Braak V-VI y de ratones APP/PS1 incubadas con el anticuerpo 6E10. Resultados obtenidos en colaboración con el Dr. Vitorica (Universidad de Sevilla).

observado en los pacientes, los animales transgénicos desarrollaron placas en el hipocampo (además del subículo y corteza perirrinal/entorrinal) desde edades muy tempranas (Fig. 3.2.5 A). Las placas incrementaron en número y tamaño (dato cuantitativo no mostrado) a lo largo de la patología hasta los 12/18 meses de edad (Fig. 3.2.5 C/D, respectivamente).

Se determinó la presencia de A β en el hipocampo de muestras humanas Braak V-VI (10 μ g) y en ratones APP/PS1 de 18 meses de edad (3 μ g) mediante la técnica de *Western blot*, empleando el anticuerpo 6E10 (A β 1-16), y como se observa en la figura suplementaria 3.3, es destacable que el hipocampo de los animales transgénicos acumulan una mayor cantidad de monómeros y oligómeros de A β en comparación con los pacientes de Alzheimer (Braak V-VI).

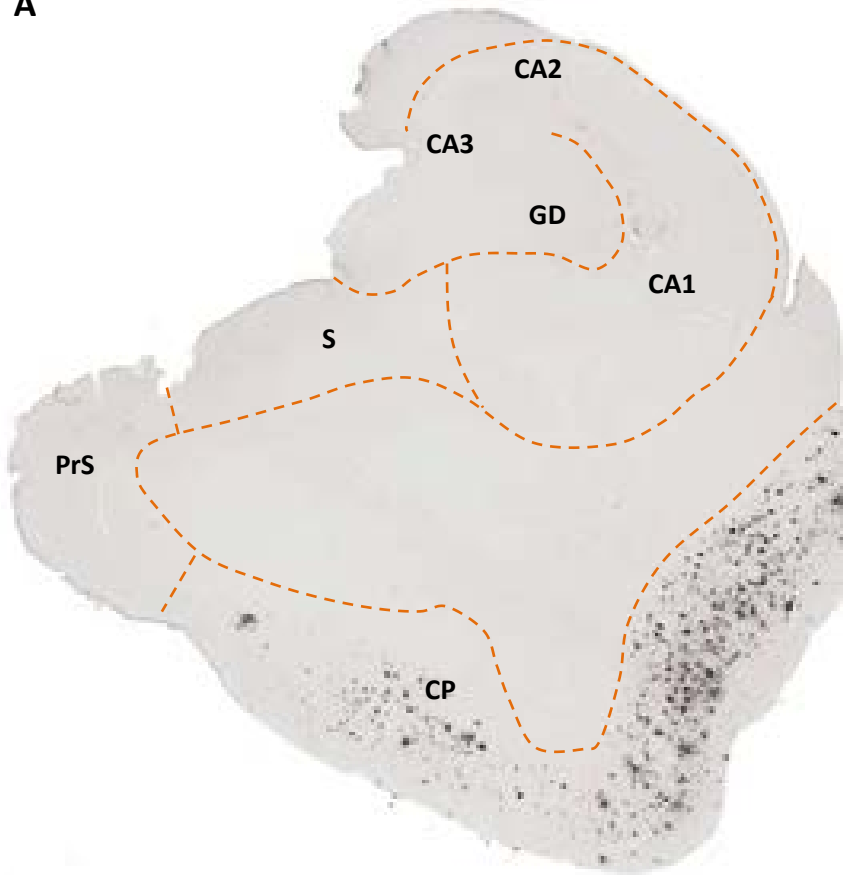
Por tanto, el modelo APP/PS1 acumuló una mayor cantidad de A β con la edad, especialmente en el subículo e hipocampo, en comparación con los pacientes de Alzheimer (Fig. 3.2.5 E-H).

Como se deduce de los resultados obtenidos hasta el momento, la acumulación extracelular de A β en el giro parahipocampal es un suceso que puede acontecer desde estadios tempranos Braak II o, por el contrario, no desarrollarse hasta estadios más avanzados Braak IV-VI (ver tabla 3.2.1). La figura 3.2.6 reúne tres ejemplos de afectación amiloide encontrados en la corteza perirrinal de las muestras humanas en cada estadio Braak. Tanto en el estadio Braak II como en Braak III-IV se encontraron casos sin depósitos OC-positivos (Fig. 3.2.6 B y F, respectivamente), casos con una carga moderada de placas (Fig. 3.2.6 C y G, respectivamente), y casos con una gran acumulación de A β extracelular en el parénquima de la corteza perirrinal (Fig. 3.2.6 D y H, respectivamente). La corteza perirrinal de los enfermos de Alzheimer desarrolló placas en todos los casos analizados (Fig. 3.2.6 J-L).

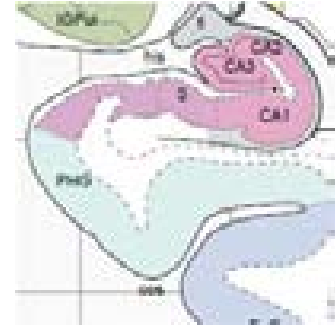
Por el contrario, el hipocampo, salvo en contados casos, presentó un patrón claro de expresión extracelular de A β característico en cada estadio de Braak: sin depósitos OC-positivos en Braak II (Fig. 3.2.6 A), con depósitos en subículo, CA1 y capa molecular del giro dentado en los individuos Braak III-IV (Fig. 3.2.6 E), y afectación del hilio del giro dentado en último lugar en los pacientes de Alzheimer (Fig. 3.2.6 I). Véase también la tabla 3.2.1.

Braak II

A



Bregma 33,1 mm



B

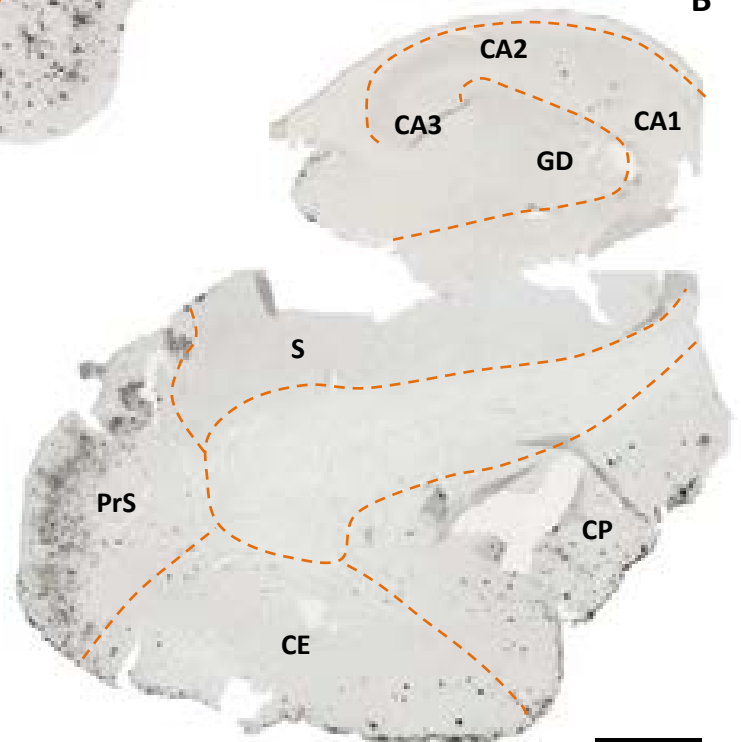


Figura 3.2.1. Patrón de distribución espacial de Aβ oligomérico, mediante inmunotinción con OC, en el hipocampo y giro parahipocampal de muestras humanas en estadio Braak II. A) Pese a la gran variabilidad que presenta la deposición de Aβ en los pacientes de Alzheimer, la mayoría de las muestras Braak II desarrollan placas en el giro parahipocampal (PrS, CE y CP). B) El hipocampo de los individuos Braak II en raras ocasiones se encuentra afectado por la patología amiloide (B), aunque cuando esto sucede son las regiones CA1 y subículo las primeras involucradas. Distancia de Bregma según Mai y col., 2008. CA: asta de Amón; GD: giro dentado; S: subículo; PrS: presubículo; CE: corteza entorrinal; CP: corteza perirrinal. Barra de escala: 2 mm.

Braak III-IV

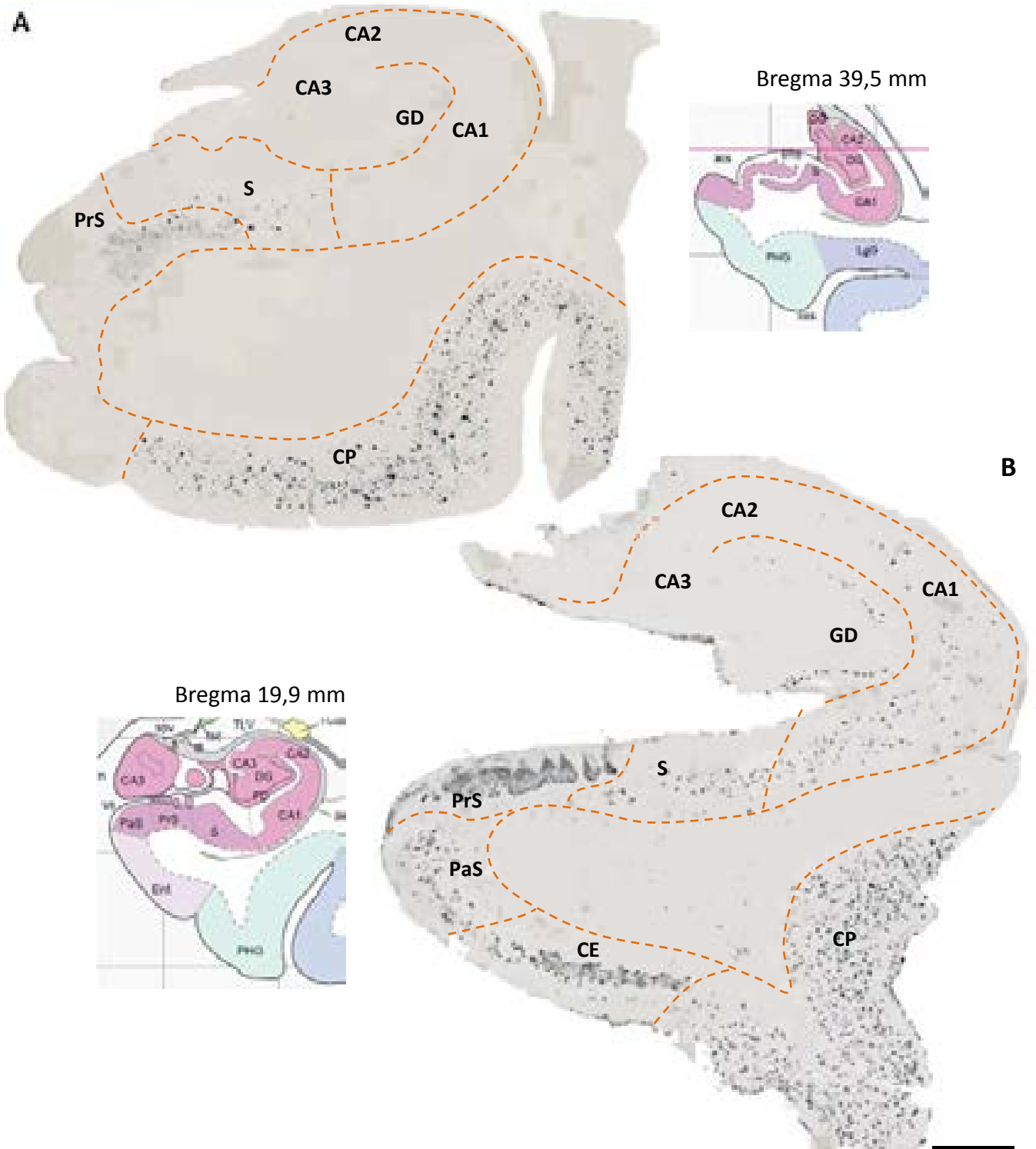


Figura 3.2.2. Patrón de distribución espacial de A β oligomérico, mediante inmunotinción con OC, en el hipocampo y giro parahipocampal de muestras humanas en estadio Braak III-IV. Todas las muestras Braak III desarrollan placas β -amiloides a lo largo de todo el giro parahipocampal (A) y, además, algunos individuos Braak IV acumulan A β también en la formación hipocampal (B), siguiendo un patrón de distribución determinado: subículo, CA y capa molecular del giro dentado. Distancia de Bregma según Mai y col., 2008. CA: asta de Amón; GD: giro dentado; S: subículo; PrS: presubículo; PaS: parasubículo; CE: corteza entorrinal; CP: corteza perirrinal. Barra de escala: 2 mm.

Braak V-VI

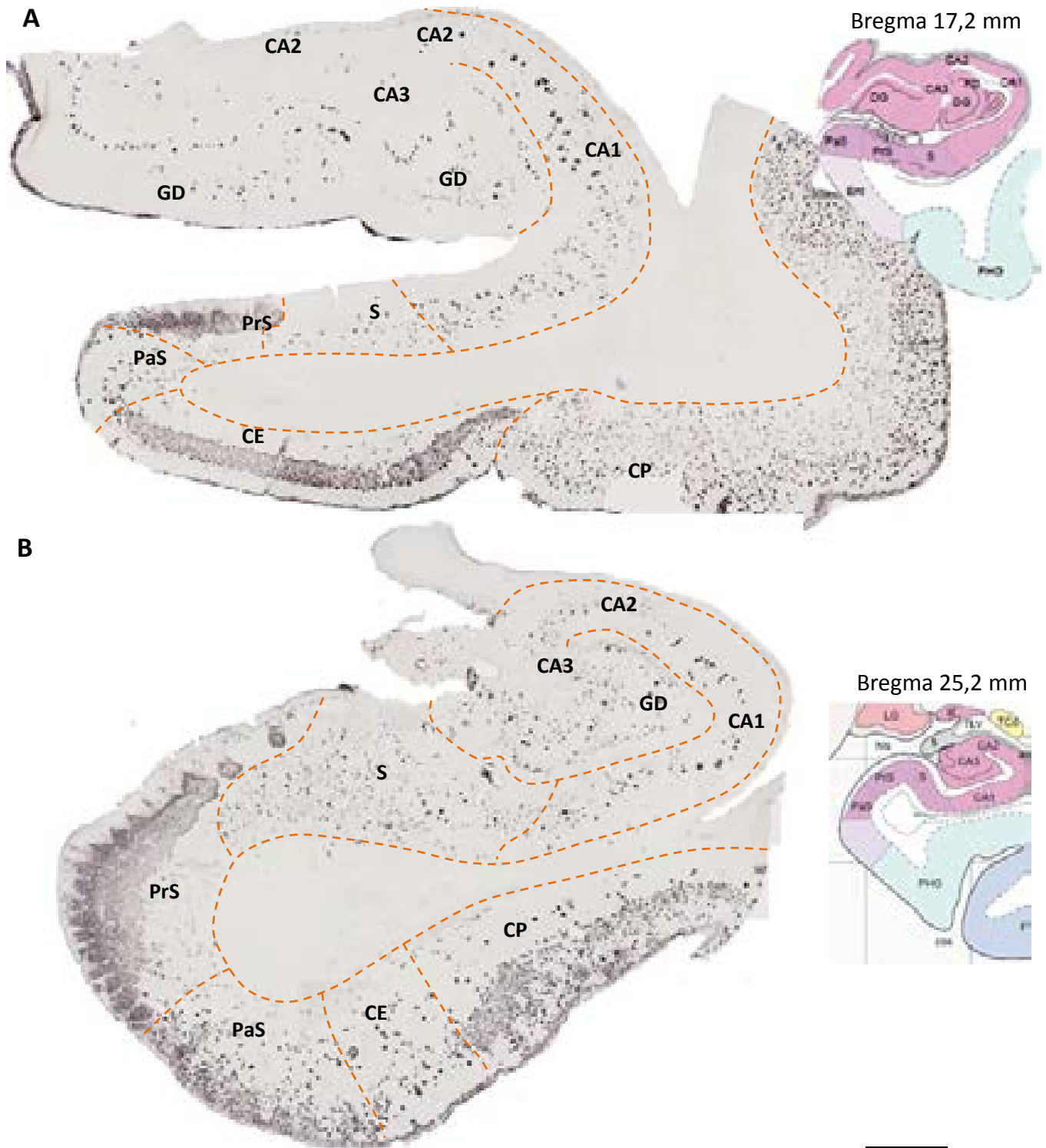


Figura 3.2.3. Patrón de distribución espacial de A β oligomérico, mediante inmunotinción con OC, en el hipocampo y giro parahipocampal de pacientes Braak V-VI. Las imágenes panorámicas de hipocampo y giro parahipocampal de pacientes con demencia muestran un claro patrón espacial diferencial de inmunotinción para OC, permitiendo la delimitación de diferentes regiones según la acumulación de A β . Todos los individuos dementes presentan placas en el hipocampo, afectando en último lugar a la capa polimórfica del giro dentado. Distancia de Bregma según Mai y col., 2008. CA: asta de Amón; GD: giro dentado; S: subículo; PrS: presubículo; PaS: parasubículo; CE: corteza entorrinal; CP: corteza perirrinal. Barra de escala: 2 mm.

Braak V-VI

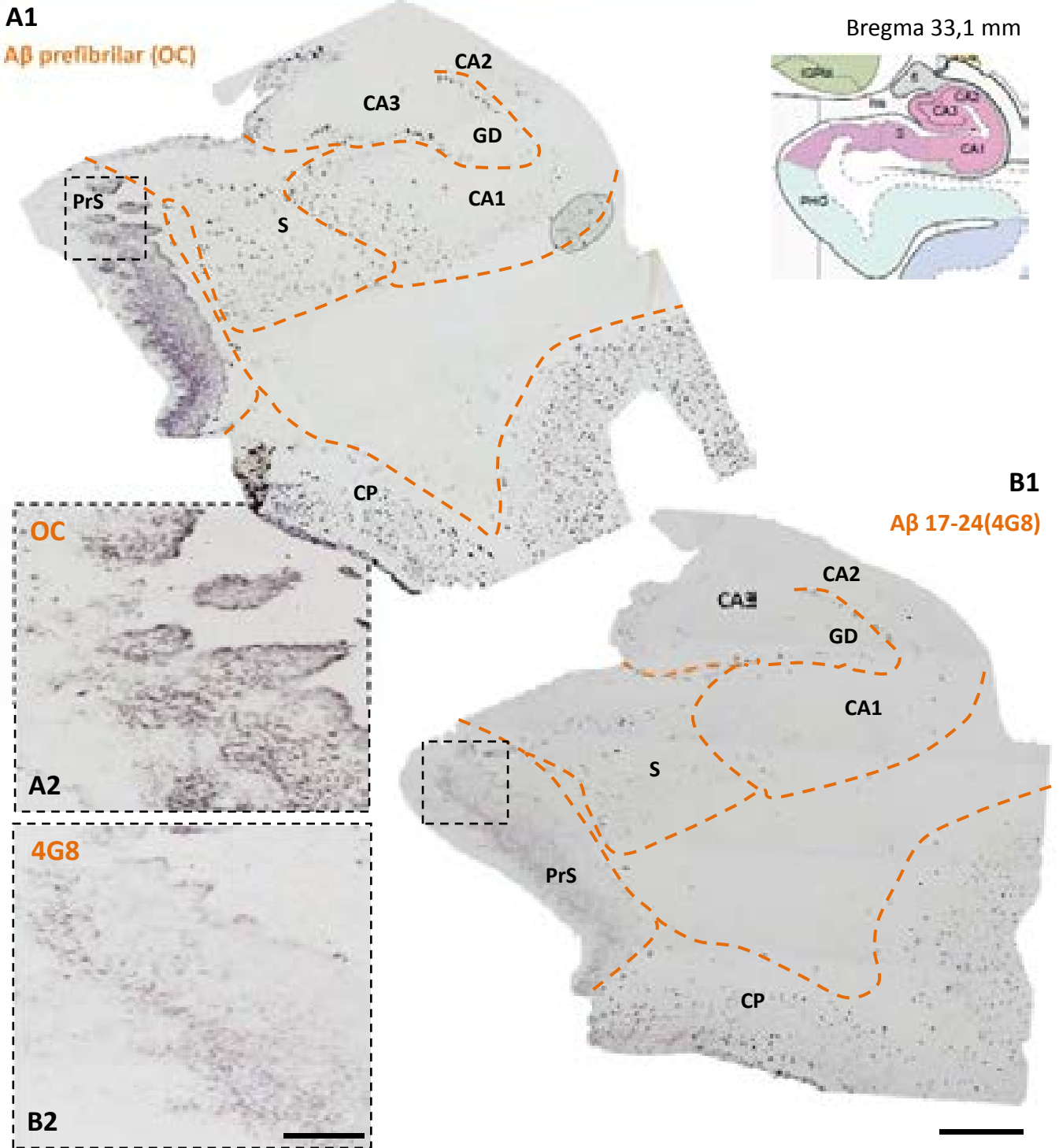
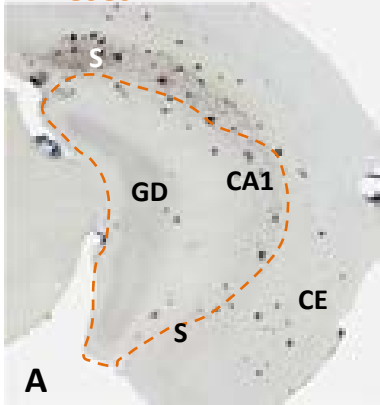


Figura 3.2.4. El anticuerpo OC reconoce una mayor cantidad de depósitos de Aβ en comparación con el anticuerpo 4G8. Estudio inmunohistoquímico comparativo entre los marcadores OC, para Aβ oligomérico (A) y 4G8, para Aβ 17-24 (B) en el hipocampo y giro parahipocampal de pacientes de Alzheimer (Braak V-VI). El anticuerpo OC, que reconoce las formas agregadas fibrilares del péptido Aβ, proporciona una mayor inmunorreactividad para el estudio de la patología amiloide, en comparación con el clásico marcador utilizado 4G8. En las imágenes de detalle A2 y B2 se muestra la región presubicular ampliada para la comparativa visual entre ambos anticuerpos. Distancia de Bregma según Mai y col., 2008. CA: asta de Amón; GD: giro dentado; S: subículo; PrS: presubiculo; CE: corteza entorrinal; CP: corteza perirrinal. Barra de escala: A1-B1: 2 mm; A2-B2: 500 μm.

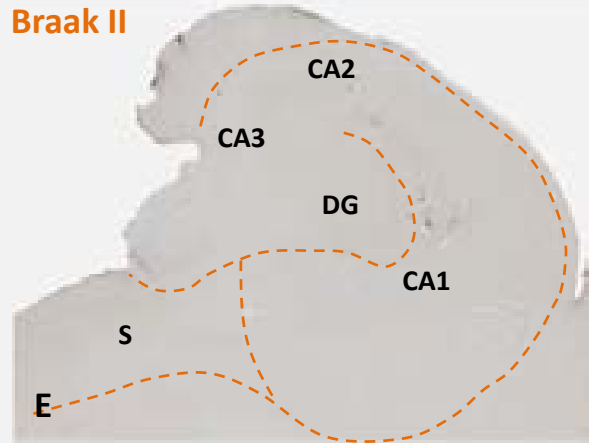
APP/PS1

Muestras humanas

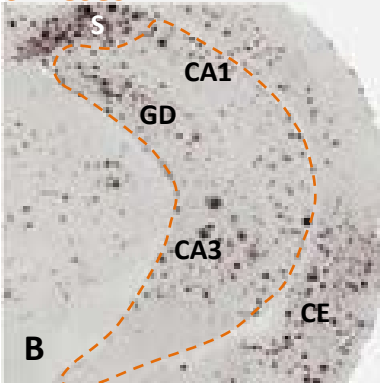
4 meses



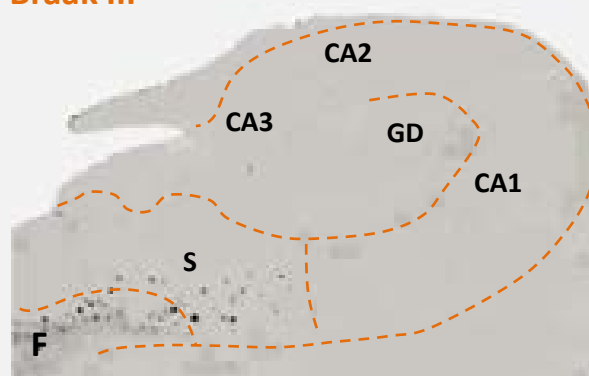
Braak II



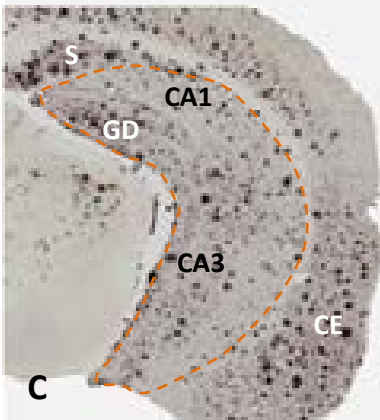
6 meses



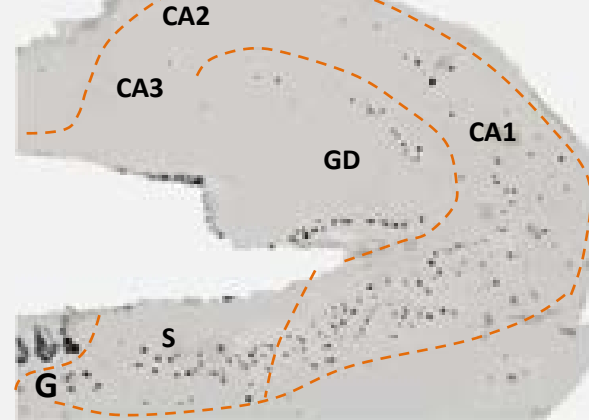
Braak III



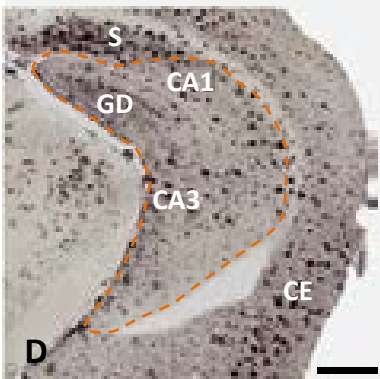
12 meses



Braak IV



18 meses



Braak V-VI

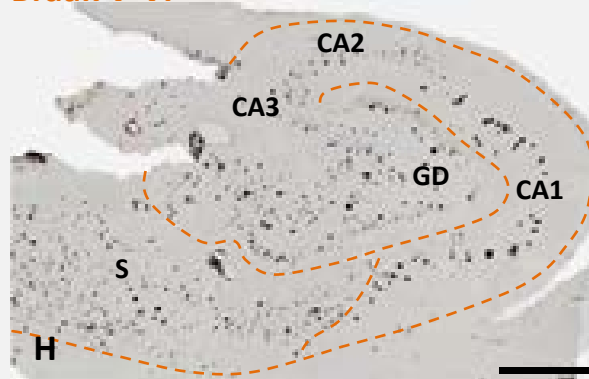


Figura 3.2.5. Los animales transgénicos APP/PS1 presentan una mayor acumulación extracelular de A β con la edad, en comparación con los pacientes de Alzheimer. Estudio inmunohistoquímico comparativo con OC en animales APP/PS1 de 4 (A), 6 (B), 12 (C) y 18 meses de edad (D) y en la formación hipocampal de individuos clasificados según los estadios de Braak (E-H). Los animales APP/PS1 desarrollan placas de gran tamaño desde los 4 meses de edad en el hipocampo, subículo y corteza perirrinial/entorrinal, que incrementan en número y tamaño a lo largo de la patología. Sin embargo, la acumulación de A β en el hipocampo de las muestras humanas es mucho más leve y tardía. *CA: asta de Amón; GD: giro dentado; S: subículo; CE: corteza entorrinal.* Barra de escala: A-D: 500 μ m; E-H: 2mm.

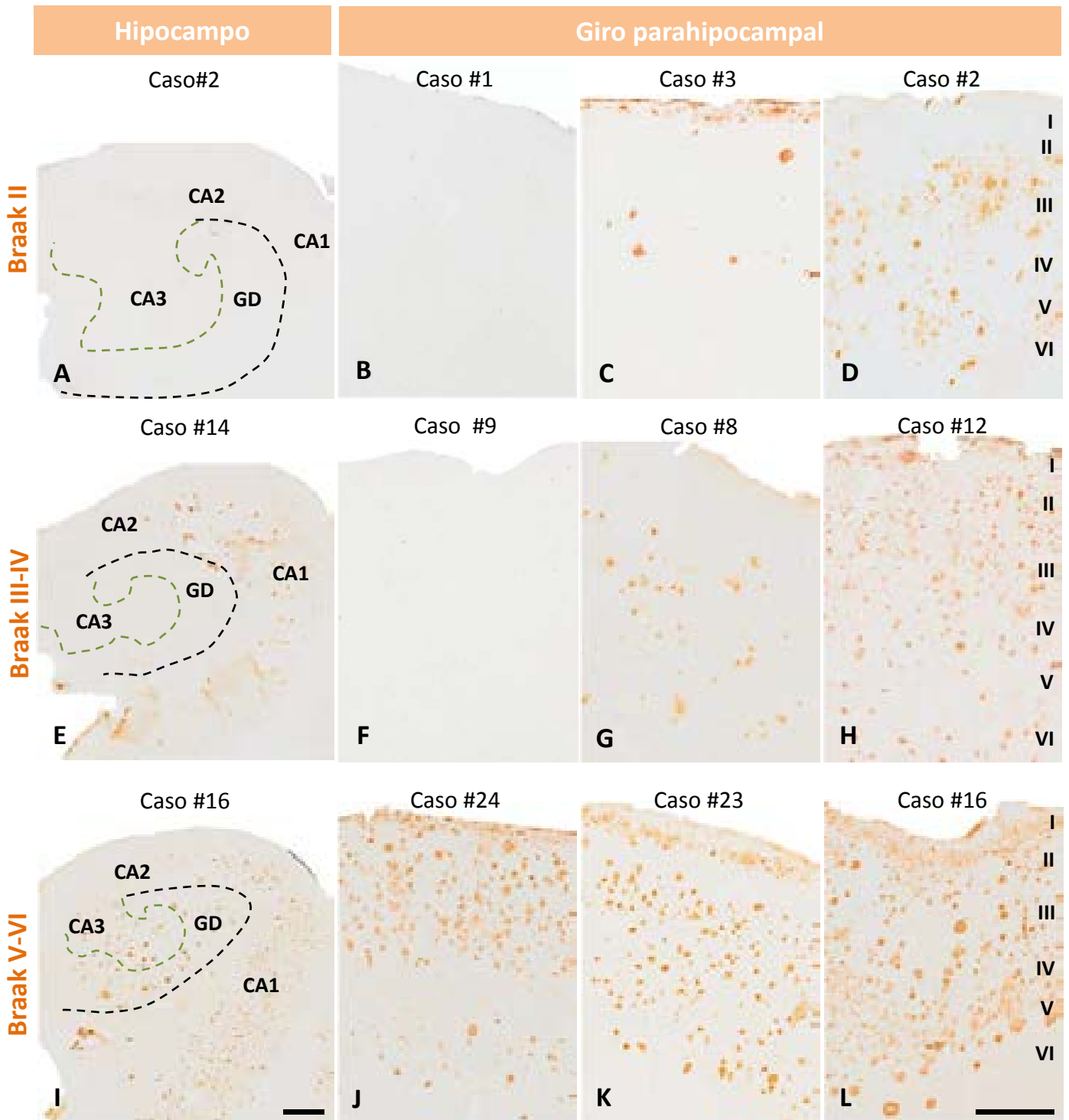


Figura 3.2.6. La afectación de la patología amiloide en el giro parahipocampal presenta una gran variabilidad entre individuos con el mismo estadio Braak. Estudio comparativo de la acumulación extracelular de A β , mediante inmunohistoquímica para OC, en el hipocampo y giro parahipocampal de diferentes individuos Braak II (A-D), Braak III-IV (E-H) y Braak V-VI (I-L). CA: *asta de Amón*; GD: *giro dentado*. Barra de escala: A-C, E-G y I-K: 500 μ m; D, H y L: 1 mm.

3.2.2. Caracterización de las placas amiloides y la degeneración neurítica asociada

- Formación hipocampal

La patología amiloide del giro dentado y la región CA1 de las muestras *post mortem* se caracterizó en detalle mediante inmunohistoquímica para diferentes formas de A β .

Se comenzó analizando el patrón espacio temporal de acumulación extracelular de β -amiloide a lo largo de los estadios de Braak, mediante el anticuerpo OC, en el giro dentado (Fig. 3.2.7 A-C) y CA1 (Fig. 3.2.7 D-F). Los primeros depósitos amiloides en el giro dentado se limitaron a la capa molecular de los individuos Braak III-IV (Fig. 3.2.7 B) y no fue hasta estadios más avanzados Braak V-VI cuando se pudieron observar en la capa polimórfica (Fig. 3.2.7 C). Aunque no fue lo más representativo, algunos casos Braak II ya presentaron placas en CA1 (Fig. 3.2.7 D), que evolucionaron en número y tamaño (desde el estrato lacunoso-molecular hacia el estrato oriens) en el estadio intermedio Braak III-IV (Fig. 3.2.7 E). Los pacientes dementes Braak V-VI mostraron depósitos extracelulares de gran tamaño en todas las capas de CA1 (Fig. 3.2.7 F).

Por tanto, y como puede observarse en la figura 3.2.8 A, la acumulación de A β en el hipocampo de las muestras humanas presentó una distribución laminar. Las placas OC-positivas que se distribuyeron en el estrato lacunoso-molecular de CA1 coinciden con las conexiones de la vía alvelar, procedentes de la corteza entorrinal, y las encontradas en la capa molecular del giro dentado con la entrada de la vía perforante (conexiones procedentes de la corteza entorrinal y que suponen la principal vía de comunicación aferente del hipocampo). Una distribución laminar similar de inmunotinción para A β , dibujando las capas molecular, granular y lacunoso-molecular, fue observada en el hipocampo de los ratones bigénicos APP/PS1, como se muestra en la figura 3.2.8 B.

Mediante inmunohistoquímica para diferentes formas de A β , se estudiaron los distintos tipos de placas seniles que se encuentran en la capa molecular del giro dentado de los pacientes de Alzheimer, según su composición y la presencia/ausencia de neuritas distróficas (Fig. 3.2.9). En la imagen panorámica del giro dentado (Fig. 3.2.9 A), se observa de nuevo cómo los depósitos amiloides se concentraron en la capa molecular de manera ordenada, en la zona de terminación de los axones de la vía perforante. Estos depósitos, con una morfología redondeada, límites definidos y de apariencia compacta, fueron positivos para el marcador de oligómeros OC (Fig. 3.2.9 B), A β 42 (Fig. 3.2.9 C), A β fibrilar (TioS, Fig. 3.2.9 D) y A β total (4G8, Fig. 3.2.9 F). Además, los estudios de doble inmunotinción demostraron la presencia de neuritas distróficas positivas para APP (Fig. 3.2.9 A y E) y para AT8 (Fig. 3.2.9 F y G) en el interior de la mayoría de los depósitos. La presencia de neuritas distróficas dentro de los depósitos amiloides parece ser una característica específica de los pacientes, ya que en modelos animales se localizan preferentemente en la periferia (ver más adelante).

Las placas amiloides presentes en la capa polimórfica del giro dentado de los pacientes de Alzheimer se distribuyeron de manera homogénea (Fig.3.2.10). Aunque presentaron una composición de A β similar a las de la capa molecular, exhibieron una apariencia estrellada y con

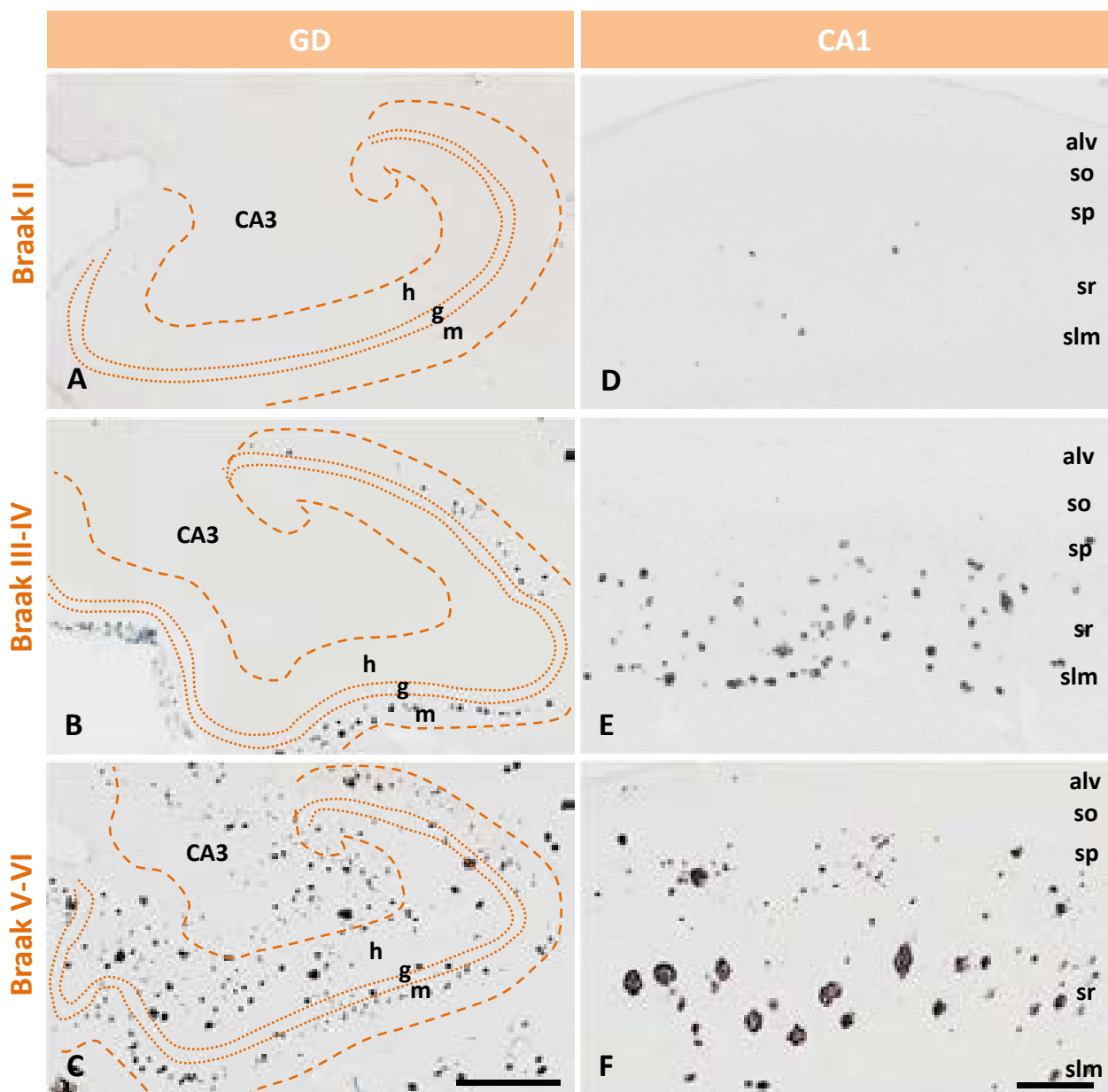


Figura 3.2.7. La acumulación extracelular de A β en el hipocampo sigue un patrón espacio-temporal a lo largo de los estadios de Braak. Inmunohistoquímica para OC en el GD (A-C) y CA1 (D-F) de individuos en estadio leve, moderado y severo. Los primeros depósitos de A β en el GD aparecen en la capa molecular de los individuos Braak III-IV (B) y no es hasta Braak V-VI cuando se observan por primera vez en el hilio (C) del GD. Sin embargo, algunos casos Braak II desarrollan pequeñas placas en CA1 (D), que evolucionan en número y tamaño en Braak III-IV (E). Los pacientes demenciales (Braak V-VI) muestran placas de gran tamaño en todas las capas del GD y CA1 (F). *GD*: giro dentado; *m*: capa molecular; *g*: capa granular; *h*: capa polimórfica o hilio; *CA*: asta de Amón; *alv*: alveus; *so*: stratum oriens; *sp*: stratum pyramidale; *sr*: stratum radiatum; *slm*: stratum lacunosum-moleculare. Barra de escala: A-C: 1 mm, D-F: 500 μ m.

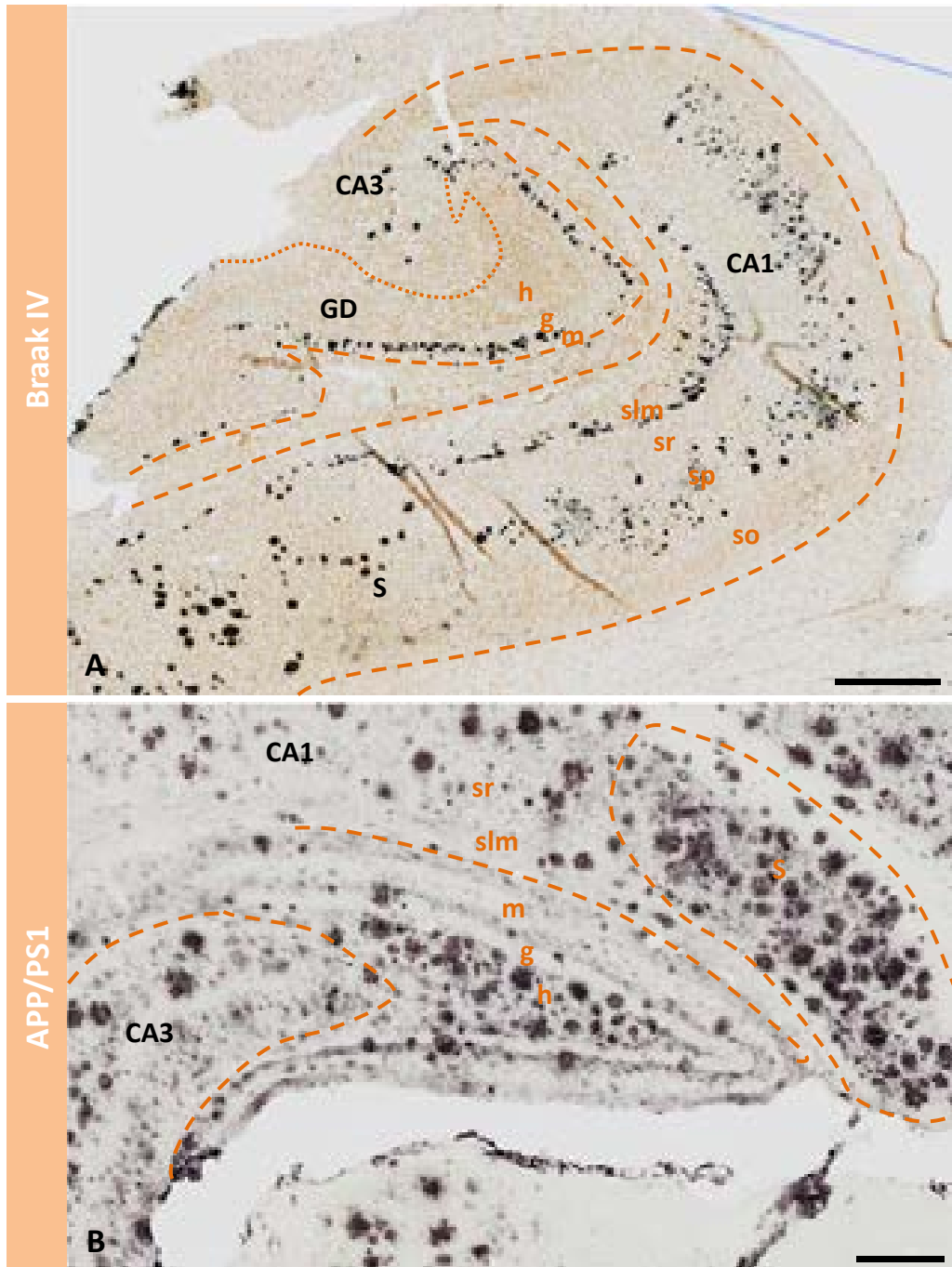


Figura 3.2.8 La acumulación extracelular de $A\beta$ en el hipocampo humano presenta una distribución laminar, al igual que ocurre en el hipocampo de modelos APP/PS1. Inmunohistoquímica para OC en el hipocampo de un individuo Braak IV (A) y de un ratón APP/PS1 de 12 meses de edad (B). Las placas distribuidas en el estrato lacunoso-molecular (slm) del paciente Braak IV coincide con las conexiones procedentes de la corteza entorrinal (CE) de la vía alveolar, al igual que las encontradas en la capa molecular del GD coinciden con las conexiones de la vía perforante, también procedentes de la CE. Esta misma distribución de $A\beta$ se observa en el hipocampo del modelo transgénico APP/PS1. CA: *asta de Amon*; h: *hilio*; g: *capa granular*; GD: *giro dentado*; m: *capa molecular*; S: *subículo*; slm: *stratum lacunoso-moleculare*; so: *stratum oriens*; sr: *stratum radiatum*. Barra de escala: A: 1 mm; B: 200 μ m.

Capa molecular

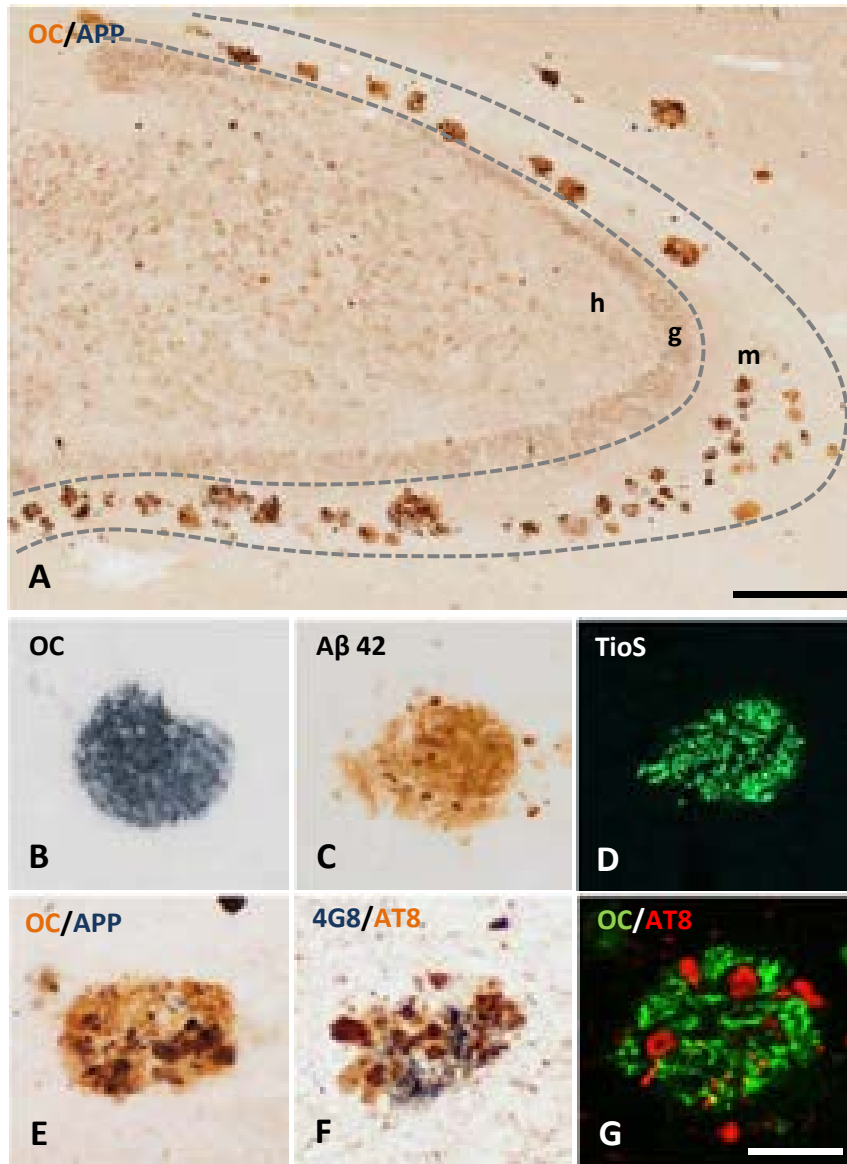


Figura 3.2.9. Estudio inmunohistoquímico de las placas seniles que se encuentran en la capa molecular del GD de pacientes de Alzheimer. La inmunotinción para diferentes formas de A β muestra que las placas de la capa molecular, que se disponen de manera ordenada siguiendo las conexiones de la vía perforante (A) son positivas para: A β oligomérico (OC, B), A β 42 (C), A β fibrilar (TioS, D) y A β total (4G8, F, en azul oscuro). Además, en estudios de doble inmunotinción se observan neuritas distróficas asociadas positivas para APP (A y E, azul oscuro) y AT8 (F, en marrón; G, en rojo). *m*: capa molecular; *g*: capa granular; *h*: capa polimórfica o hilio. Barra de escala: A: 500 μ m; B-G: 50 μ m.

límites indefinidos (Fig. 3.2.10 inserto en A) parecida a la hallada en los ratones APP/PS1 (mostrado más adelante). Estos depósitos fueron positivos para A β oligomérico (OC, Fig. 3.2.10 B y H1), A β 42 (Fig. 3.2.10 C), A β fibrilar (Tioflavina-S, Fig. 3.2.10 D) y A β total (4G8, Fig. 3.2.10 G). Además, en la periferia de estas placas se observaron abundantes y enormes distrofias neuríticas, positivas para APP (Fig. 3.2.10 E) y para AT8 (Fig. 3.2.10 F y G). Por último, como muestran las imágenes del doble marcaje fluorescente OC/Tio-S para microscopía láser confocal (Fig. 3.2.10 H1-H3), estos depósitos de A β presentaron una composición muy fibrilar (Fig. 3.2.10 H2) y un pequeño anillo periférico de oligómeros OC-positivo alrededor (Fig. 3.2.10 H3).

Previo a la caracterización de la patología amiloide en la región CA1, se comparó la acumulación de A β extracelular en las diferentes regiones del hipocampo propio de los pacientes de Alzheimer, mediante inmunohistoquímica simple con OC y doble para 4G8/AT8 (Fig. 3.2.11). Los depósitos amiloides de CA3 fueron similares a los observados previamente en el hilio del giro dentado: estrellados, fibrilares, neuríticos y distribuidos homogéneamente (Fig. 3.2.11 A, ver inserto); la región CA2 no desarrolló placas típicas, sino que el A β parecía acumularse en el interior neuronal (Fig. 3.2.11 B, ver inserto); y las placas de la región CA1, analizadas en detalle más adelante, exhibieron una apariencia totalmente diferente, aunque mostraron neuritas distróficas AT8-positivas la mayor parte de ellas (Fig. 3.2.11 D).

En la figura 3.2.12 se analizan los diferentes tipos de placas seniles encontrados en la región CA1 del hipocampo de pacientes dementes Braak V-VI. La serie de imágenes A de la misma figura, obtenidas tras inmunomarcaje con OC, muestran los diversos morfotipos de depósitos amiloides (globosos y compactos, A1; en forma de corona, A2; o clásicos con núcleo denso y halo, A3 y A4), que podrían representar en realidad, diferentes planos de corte de un mismo tipo de placa de A β . Los depósitos clásicos fueron los más abundantes en la región CA1. Se caracterizaron por presentar un núcleo compacto y fibrilar, positivo para A β 42 (Fig. 3.2.12 B), A β total (Fig. 3.2.12 C) y Tioflavina-S (Fig. 3.2.12 F2); y un halo difuso alrededor, no fibrilar (negativo para Tio-S, Fig. 3.2.12 F3), con débil inmunomarcaje para A β 42. Por tanto, a diferencia de lo observado en el giro dentado, estos depósitos presentaron A β fibrilar únicamente en el centro, como se observa en las imágenes de microscopía láser confocal de la figura 3.2.12 (F).

Asimismo, las placas clásicas de CA1 presentaron, en la mayoría de los individuos Braak V-VI, distrofias neuríticas asociadas positivas para APP (Fig. 3.2.12 D) y fosfo-tau (Fig. 3.2.12 E), dispuestas entre el núcleo denso y el halo difuso.

- *Giro parahipocampal*

La acumulación extracelular de A β en el giro parahipocampal de las muestras humanas también se analizó detenidamente. En primer lugar, se realizó un estudio comparativo de la patología amiloide en las diferentes regiones del giro parahipocampal de individuos en estadio leve y estadio avanzado de la patología tau (Fig. 3.2.13 y Fig. 3.2.14, respectivamente). Mediante

inmunotinción simple para OC y doble OC/APP, se determinó que la acumulación de A β en la capa parvopiramidal del presubiculo tanto de individuos Braak II-III (en los casos en los que estaba presente) (Fig. 3.2.13 A1) como de individuos dementes Braak V-VI (Fig. 3.2.14 A1), fue siempre de aspecto difuso. La acumulación de amiloide encontrada en el presubiculo, de aspecto difusa no formando placas definidas, compatible con una posible localización intracelular sináptica (esto habría que comprobarlo con dobles marcajes OC con marcadores sinápticos), representa un patrón específico de esta región (ver imagen A de la Fig. 3.2.14), al igual que ocurre con la banda de A β en la capa subpial de la corteza a lo largo de todo el giro parahipocampal (no mostrado). La corteza entorrinal (Fig. 3.2.13, B-C) y la corteza perirrinal (Fig. 3.2.13 D-E) de los estadios más leves, presentaron, según el caso estudiado (ver tabla 3.2.1), acúmulos difusos (detalle B1 y D1 de la Fig. 3.2.13, respectivamente) o con neuritas distróficas asociadas (detalle C1 y E1 de la Fig. 3.2.13, respectivamente). Sin embargo, ambas regiones del giro parahipocampal de pacientes de Alzheimer Braak V-VI, desarrollaron siempre placas difusas y neuríticas con diferentes proporciones de uno u otro tipo (Fig. 3.2.14 B1 y C1). Además, las capas superficiales II-III de la corteza entorrinal se encontraron más afectadas por la patología amiloide que las profundas (Fig. 3.2.14 B), no así en la corteza perirrinal, que presentó un grado de afectación similar a lo largo de toda la laminación cortical (Fig. 3.2.14 C).

A diferencia de lo observado en la formación hipocampal, las placas de regiones corticales del giro parahipocampal, como la corteza perirrinal o la corteza entorrinal (no mostrada), presentaron una gran variabilidad, dentro del mismo individuo y entre las diferentes muestras analizadas, en cuanto a la composición (fibrilares/difusas) y a la proporción de placas neuríticas. La serie de imágenes A1-A3 de la figura 3.2.15 representan tres ejemplos con diferentes cantidades de placas neuríticas OC/APP-positivas en la corteza perirrinal de enfermos Braak V-VI (de menor a mayor proporción). Igualmente, mediante inmunotinción simple con el marcador OC se pudieron reconocer los diferentes tipos de placas halladas en la corteza perirrinal: difusas (Fig. 3.2.15 B1), globosas y compactas (Fig. 3.2.15 B2 y B4) y clásicas (Fig. 3.2.15 B3 y B5).

Posteriormente, se analizaron también de manera comparativa los diferentes tipos de depósitos de A β en la corteza del giro parahipocampal de los enfermos de Alzheimer (Braak V-VI) (Fig. 3.2.16), que se resumieron en placas difusas y placas neuríticas. Los depósitos difusos observados presentaron una morfología indefinida y no compacta; fueron positivos para A β 42 (Fig. 3.2.16 A), 4G8 (Fig. 3.2.16 B) y OC (Fig. 3.2.16 E1), y negativos para Tioflavina S (Fig. 3.2.16 E2); y no exhibieron neuritas distróficas asociadas (Fig. 3.2.16 C y D). Las placas neuríticas fueron, en su mayoría, de tipo clásico y se comportaron como las estudiadas previamente en la región CA1 (Fig. 3.2.16 F-J). También, se analizó la relación microglía/A β específica para ambas clases de depósitos amiloides, comprobándose mediante doble inmunotinción para amiloide (OC) y microglía (Iba1), que las placas difusas no desencadenaban activación microglial (Fig. 3.2.16 K), mientras que sí lo hacían las placas neuríticas, observándose una estrecha interacción microglía/A β como se aprecia en la

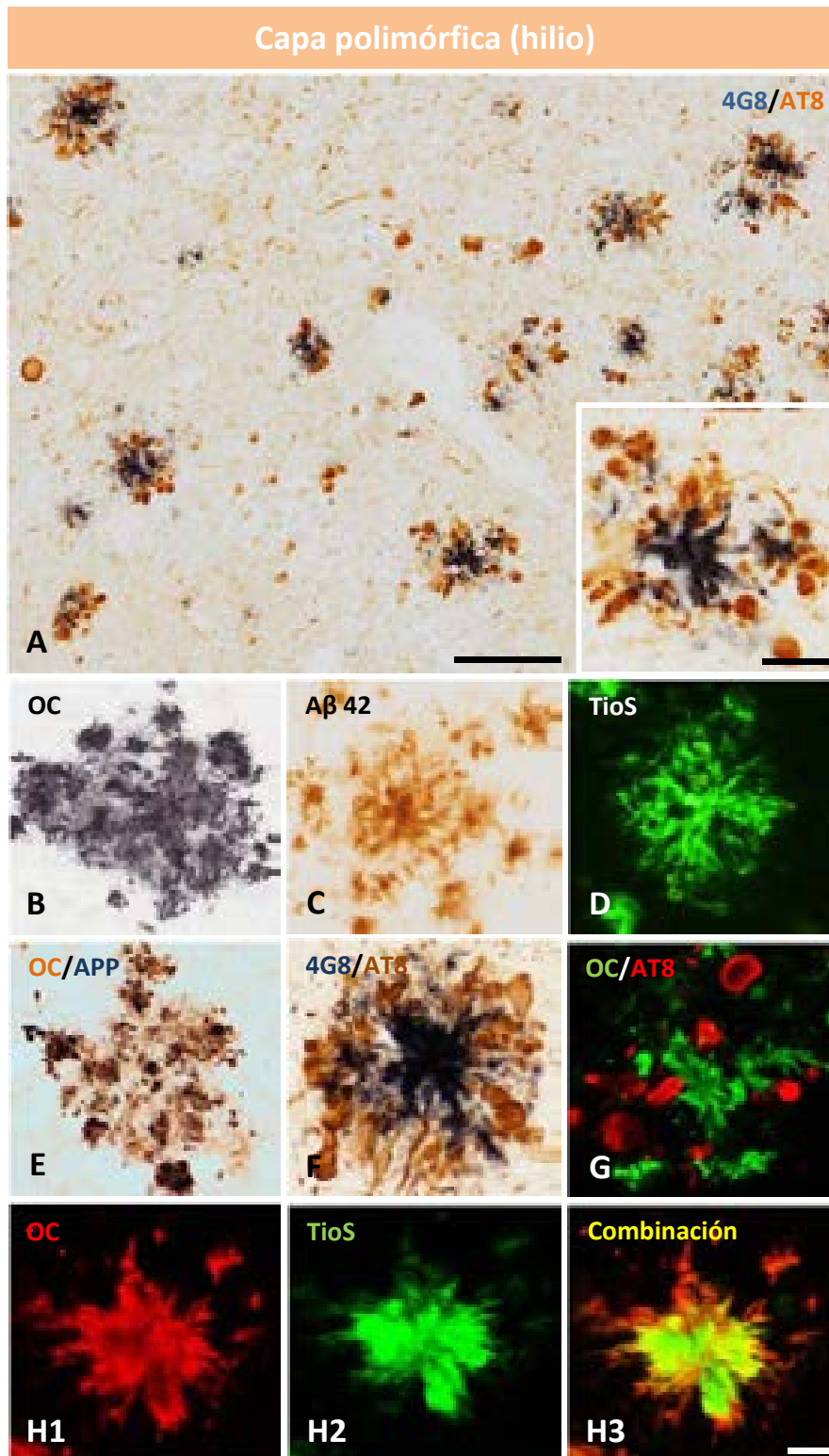


Figura 3.2.10. Estudio inmunohistoquímico de las placas seniles que se encuentran en la capa polimórfica (hilio) del GD de pacientes de Alzheimer. Los depósitos amiloides del hilio del GD, que aparecen únicamente en las fases más avanzadas de la enfermedad (Braak V-VI), muestran una morfología estrellada y son inmunorreactivos para A β oligomérico (OC, H1 y B), A β 42 (C), A β fibrilar (TioS, D y H2) y A β total (4G8, A y F, en azul oscuro). Además, exhiben abundantes neuritas distróficas, positivas para APP (E, en azul oscuro) y AT8 (A y F, en marrón). Estos depósitos de A β presentan una composición altamente fibrilar y un pequeño halo oligomérico (H3). Inmunohistoquímica doble (A, E y F) o simple (B,C) para microscopía óptica convencional. Inmunofluorescencia doble para microscopía confocal (G, H1-H3). Barra de escala: A: 100 μ m; inserto en A: 25 μ m; B-H: 25 μ m.

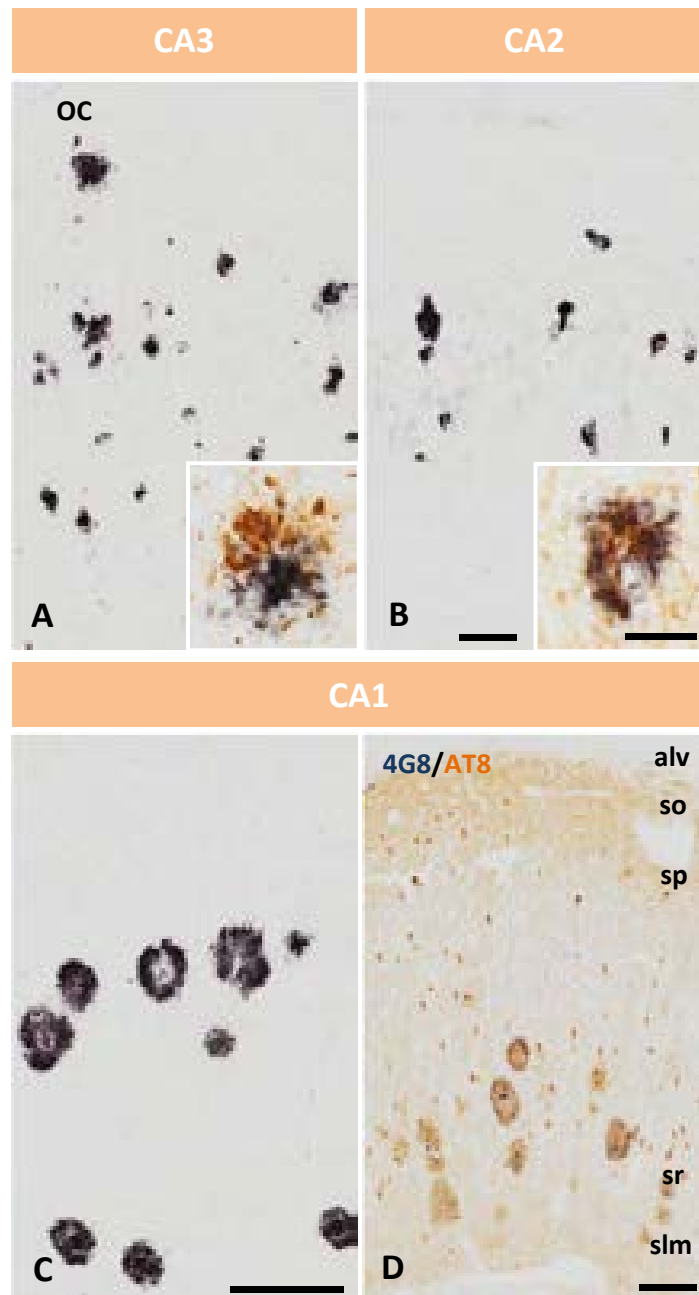


Figura 3.2.11. Acumulación diferencial de A β en las regiones del hipocampo propio (CA) de pacientes dementes Braak V-VI. Inmunohistoquímica simple para OC y doble para 4G8/AT8 en las regiones CA3 (A), CA2 (B) y CA1 (C y D) del hipocampo de individuos Braak V-VI. Los depósitos amiloides de CA3 (A) son similares a los previamente observados en el GD. La región CA2 no desarrolla placas extracelulares típicas, sino que el A β parece encontrarse en el interior neuronal (inserto en B). Las placas de CA1, que presentan en su mayoría neuritas distróficas AT8-positivas (D), se analizan más adelante. alv: *alveus*; so: *stratum oriens*; sp: *stratum pyramidale*; sr: *stratum radiatum*; slm: *stratum lacunosum-moleculare*. Barra de escala: A-B: 50 μ m; inserto en A-B: 25 μ m; C-D: 200 μ m.

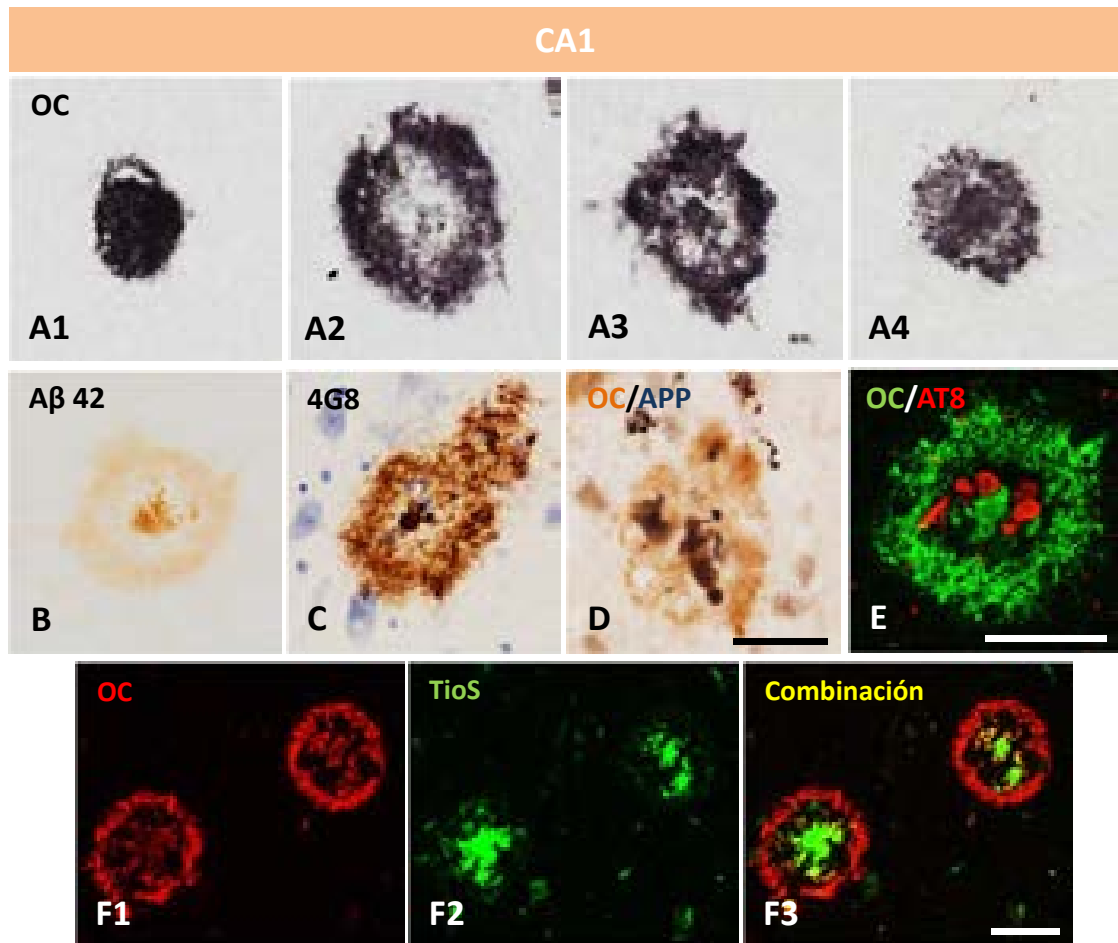


Figura 3.2.12. Estudio inmunohistoquímico de los diferentes tipos de placas seniles que se encuentran en la región CA1 del hipocampo de individuos Braak V-VI. Mediante inmunomarcado con OC se observan varios tipos de placas de A β (globosas, A1; en forma de corona, A2; o clásicas con núcleo denso y halo, A3 y A4) que podrían corresponder, en realidad, a diferentes planos de corte de un mismo tipo de depósito amiloide. Las placas clásicas son las más abundantes en CA1 y todas presentan un núcleo compacto (positivo para A β 42, B; A β total, C; y TioS, F2) y un halo difuso alrededor no fibrilar, con menor intensidad de inmunomarcado para A β 42 y negativo para TioS. Este tipo de placa además, presenta normalmente neuritas distróficas positivas para APP (D, en azul oscuro) y AT8 (E, en rojo), que se disponen entre el núcleo denso y el halo difuso. A diferencia de las placas del giro dentado, éstos depósitos presentan A β fibrilar únicamente en el centro, como muestran las imágenes de microscopía láser confocal (F1-F3). Barra de escala: 50 μ m.

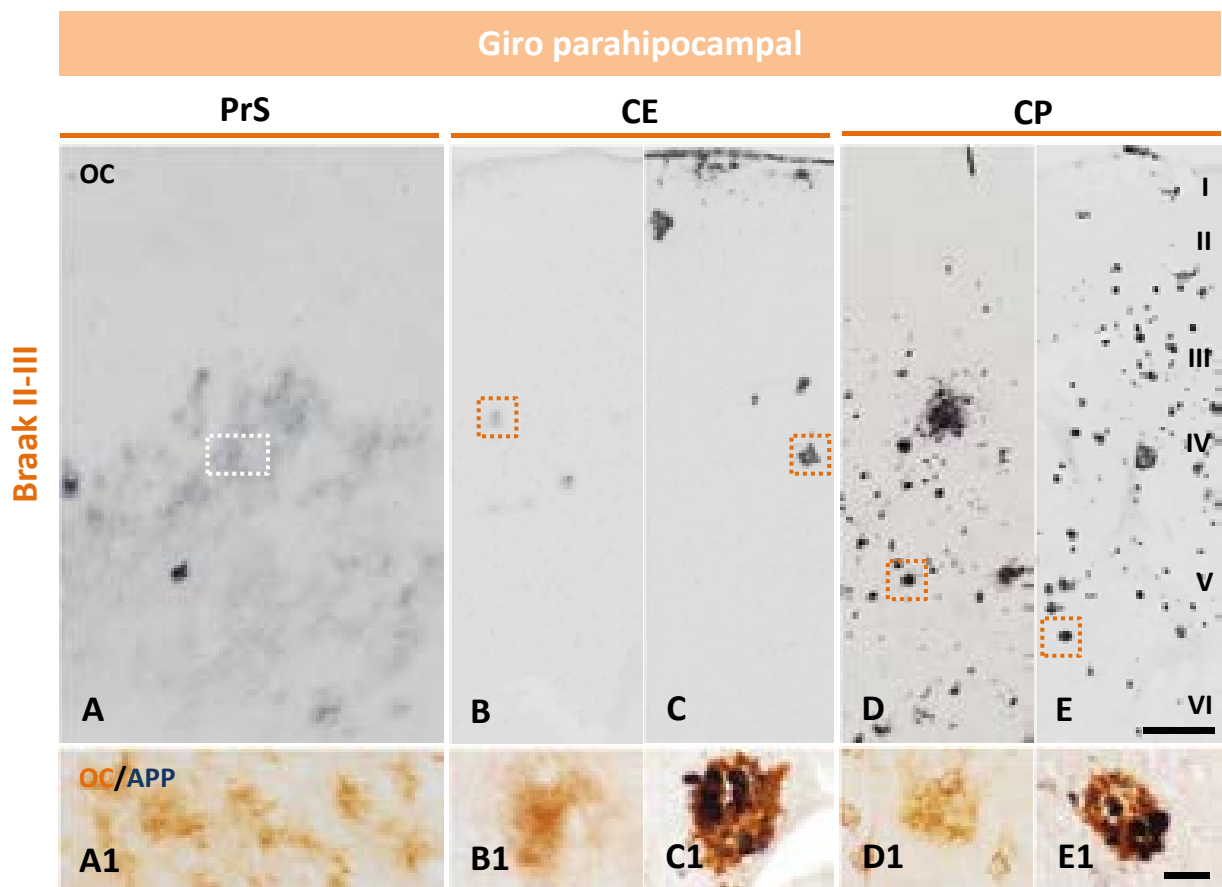


Figura 3.2.13. Análisis comparativo de la acumulación de A β con el anticuerpo OC en las diferentes regiones del giro parahipocampal (presubiculo, A; corteza entorrinal, B y C; y corteza perirrinal, D y E) de pacientes en estadios Braak II-III. Inmunohistoquímica simple para OC (A-E) o doble OC/APP (A1-E1). La acumulación de A β del presubiculo es siempre de aspecto difuso (A1), mientras que en la corteza entorrinal y perirrinal se aprecian tanto acúmulos difusos (B1 y D1, respectivamente) como con neuritas distróficas asociadas (C1 y E1, respectivamente). Barra de escala: A-E: 250 μ m; A1-E1: 25 μ m.

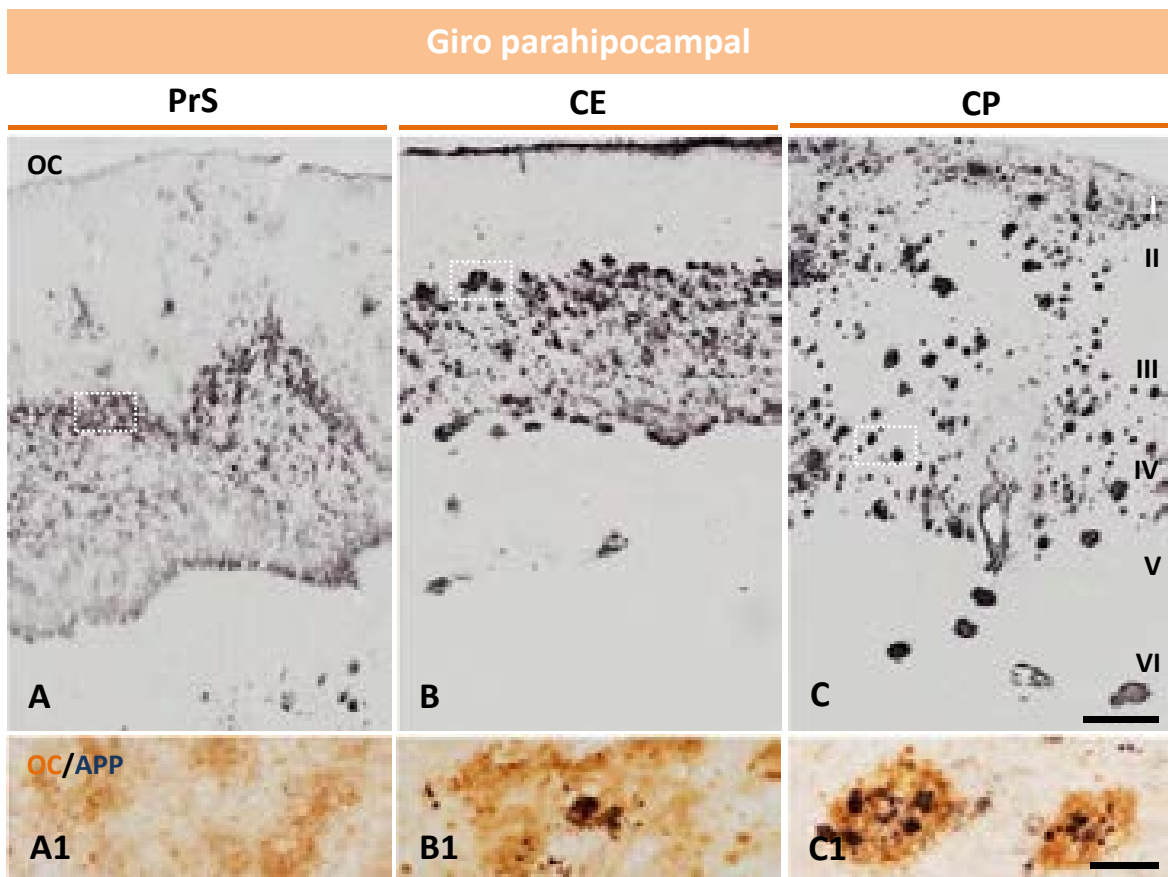


Figura 3.2.14. Análisis comparativo de la acumulación de A β con el anticuerpo OC en las diferentes regiones del giro parahipocampal (presubículo, A; corteza entorrinal, B; y corteza perirrinal, C) de pacientes con la enfermedad de Alzheimer. La acumulación de A β en el presubículo es siempre de aspecto difuso a lo largo de todos los estadios Braak (A), mientras que la CE (B1) y CP (C1) presentan siempre placas difusas y neuríticas con diferentes proporciones de uno u otro tipo según el individuo estudiado. Además, las capas superficiales II-III de la CE se encuentran más afectadas por la patología amiloide (B) que las capas profundas, no así en la CP, que presenta un grado de afectación similar a lo largo de toda la laminación cortical. Inmunohistoquímica simple para OC (A-C) o doble OC (naranja)/APP (azul oscuro) (A1-C1). Barra de escala: A-C: 250 μ m, A1-C1: 25 μ m.

Giro parahipocampal

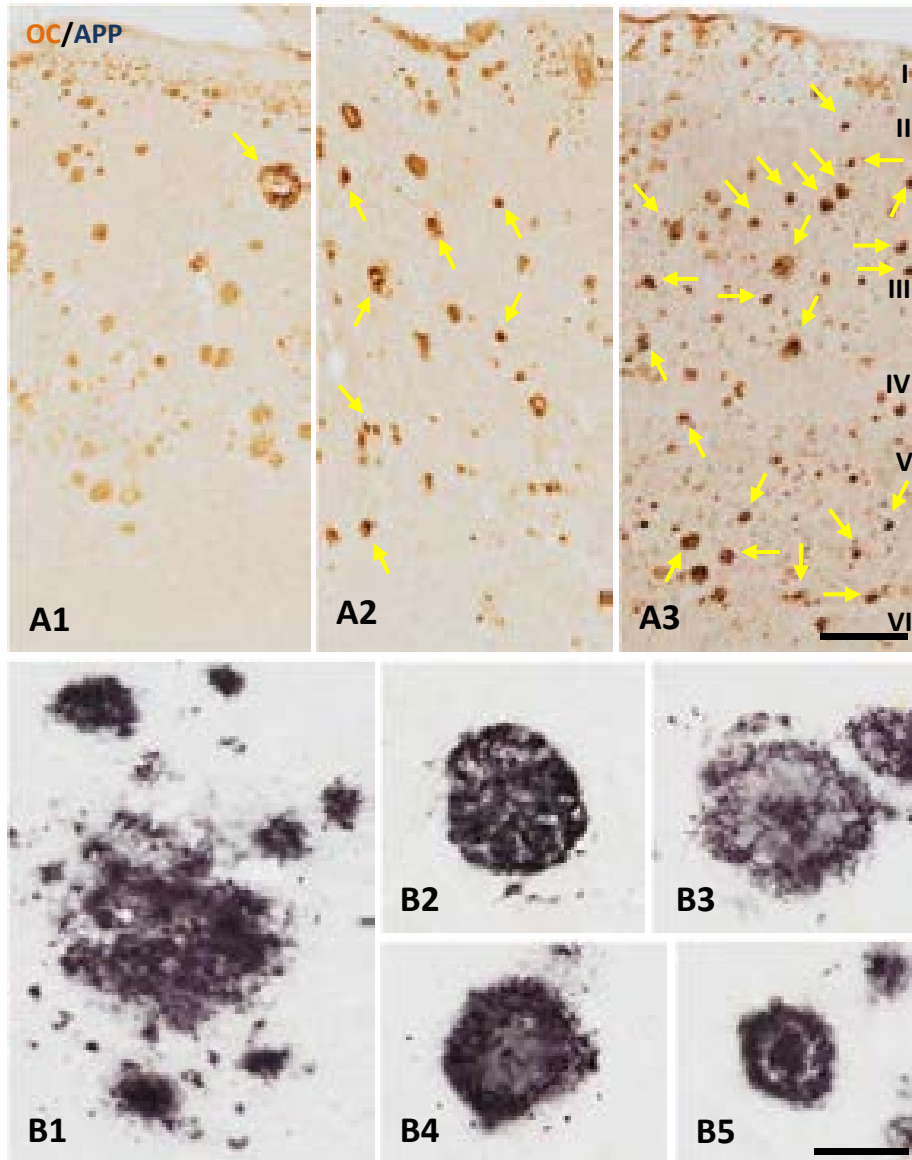


Figura 3.2.15. El giro parahipocampal de pacientes con Alzheimer (Braak V-VI) presenta una gran variabilidad en la proporción de placas neuríticas. Análisis representativo de la carga diferencial de depósitos neuríticos mediante inmunohistoquímica doble para OC y APP (A) en la corteza perirrinal de diferentes casos Braak V-VI. La corteza perirrinal del GPH, al igual que ocurre con la CE, puede presentar diferentes proporciones de placas difusas y neuríticas según el individuo analizado (A1-A3, flechas indican placas neuríticas). Los diferentes tipos de placas pueden reconocerse empleando el marcador OC (difusas, B1; clásicas, B2-B5). Barras de escala: A1-A3: 250 μ m; B1-B5: 50 μ m.

figura 3.2.16 (L). El estudio detallado de la microglia asociada a las placas y su posible relación funcional se describe en el siguiente capítulo de resultados.

Como resumen y ejemplo de la gran variabilidad encontrada en la patología neurítica asociada a los diferentes tipos de depósitos amiloides en los pacientes de Alzheimer, se llevó a cabo un análisis comparativo de los tipos de placas que aparecen en las regiones del giro dentado, CA1 y giro parahipocampal en dos casos Braak V-VI, uno con moderada afectación neurítica (Fig. 3.2.17) y otro con una gran proporción de placas AT8-positivas (Fig. 3.2.18). Ambos individuos presentan una enorme cantidad de distrofias grandes alrededor de todos los depósitos del giro dentado (ver imágenes A1-A3 de las figuras 3.2.17 y 3.2.18). Sin embargo, la región CA1 del individuo con patología neurítica moderada exhibió una menor proporción de placas (clásicas en su mayoría) con distrofias positivas para fosfo-tau (Fig. 3.2.17 B1-B3) en comparación con el caso más severo (Fig. 3.2.18 B1-B3). La mayor variabilidad se encontró en la corteza del giro parahipocampal, presentando depósitos difusos y clásicos con y sin distrofias (Fig. 3.2.17 C1, C2 y C3, respectivamente) en el caso con patología neurítica cortical leve; y placas altamente neuríticas en la mayoría de los depósitos amiloides en el individuo analizado en la figura 3.2.18 (C1-C3).

Estudios previos en nuestro modelo animal de la enfermedad de Alzheimer, acerca de la evolución de las propiedades fibrilares de los depósitos de Abeta, han demostrado una disminución en el grado de compactación (medido por análisis de imagen como densidad de inmunotinción) de las placas con la edad en el subículo e hipocampo del ratón transgénico APP/PS1 (datos no mostrados, Nuñez-Díaz 2014), como puede observarse también en las imágenes A y B de la figura 3.2.19 del estudio inmunohistoquímico con OC en el subículo de ratones APP/PS1 de 4 y 12 meses de edad, respectivamente. Sin embargo, al contrario de lo que ocurre en el modelo transgénico y como se muestra en las imágenes (Fig. 3.2.19 C y D), las placas de la corteza perirrinal en los estadios más avanzados son más compactas en comparación con los individuos de estadios tempranos Braak II. A pesar de lo observado, el análisis de la densidad óptica de los depósitos OC-inmunopositivos de la corteza perirrinal no demostró cambios significativos en el grado de compactación de las placas de A β a lo largo de la progresión de la enfermedad (Fig. 3.2.19 E).

Para completar el análisis inmunohistoquímico se realizó un estudio cuantitativo de la carga de A β en la corteza perirrinal a lo largo de los estadios de Braak. A pesar de la gran variabilidad que presentó la patología amiloide en el giro parahipocampal de las muestras *post mortem* analizadas (Fig. 3.2.20 A), se observó un incremento significativo de los niveles de A β extracelular, positivos para OC, en la corteza perirrinal de los pacientes dementes Braak V-VI en comparación con los individuos Braak II de la misma edad (Fig. 3.2.20 A).

Para resumir la caracterización de los diferentes tipos de placas seniles que desarrollan en los pacientes de Alzheimer, se procedió a un estudio comparativo entre los ratones transgénicos APP/PS1 y las diferentes regiones del hipocampo y giro parahipocampal de los enfermos de

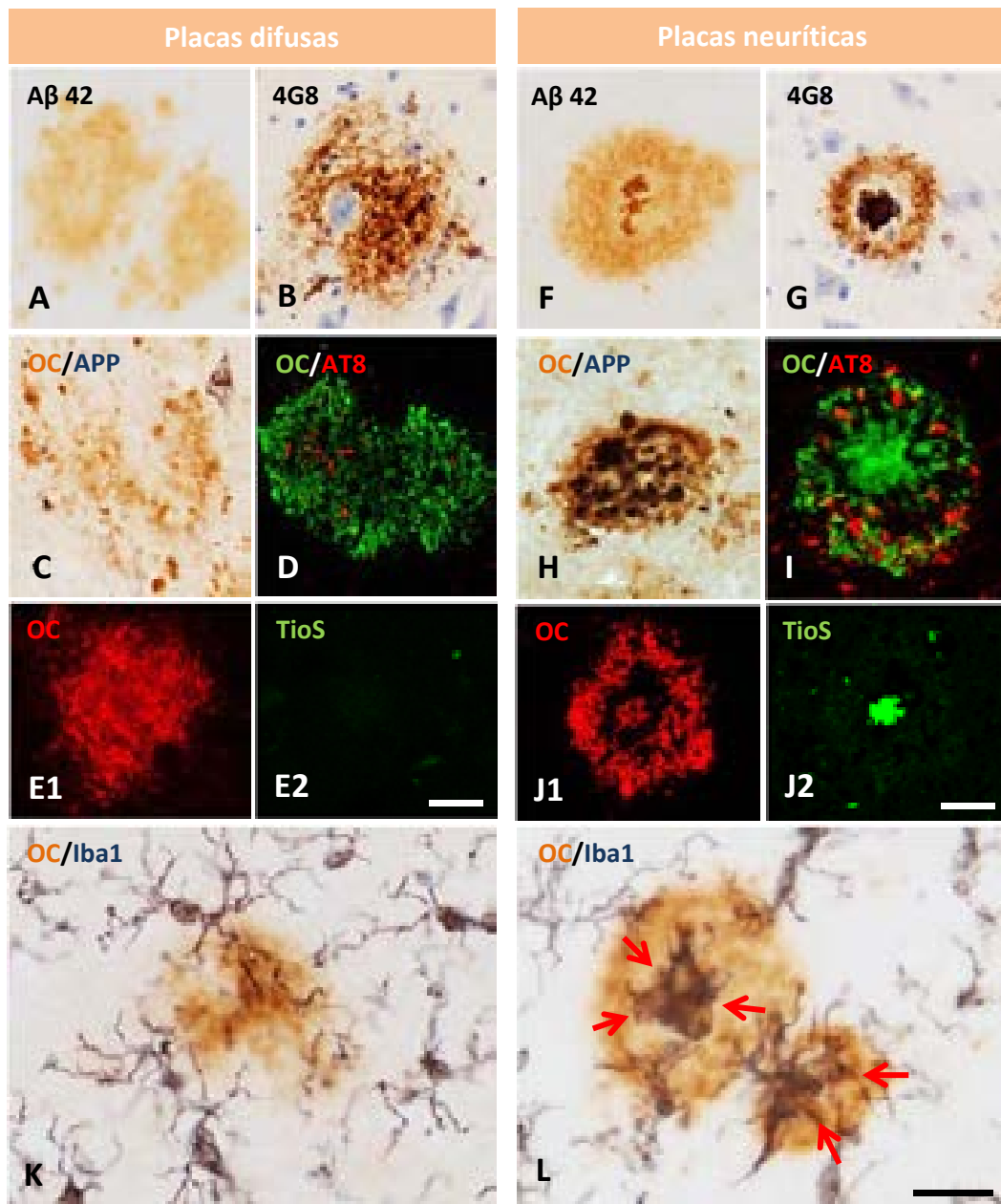


Figura 3.2.16. Estudio inmunohistoquímico comparativo de los diferentes tipos de placas seniles que se encuentran en la corteza del giro parahipocampal de pacientes dementes Braak V-VI. Las placas difusas (A-E) presentan una morfología indefinida, no compacta, son positivas para Aβ42 (A), 4G8 (B) y OC (C), negativas para TioS (E2) y no desarrollan neuritas distróficas asociadas (C y D). Los depósitos neuríticos son, en su mayoría, placas de tipo clásico y se comportan como las estudiadas en CA1 (F-J). Mediante inmunotinción doble para amiloide (OC, en naranja) y microglía (Iba1, en azul oscuro) se observa como las placas difusas no son reactivas para las células microgliales (K), mientras que las placas neuríticas interactúan estrechamente con la microglía (L, flechas indican células microgliales activadas). Barra de escala: 25 μm.

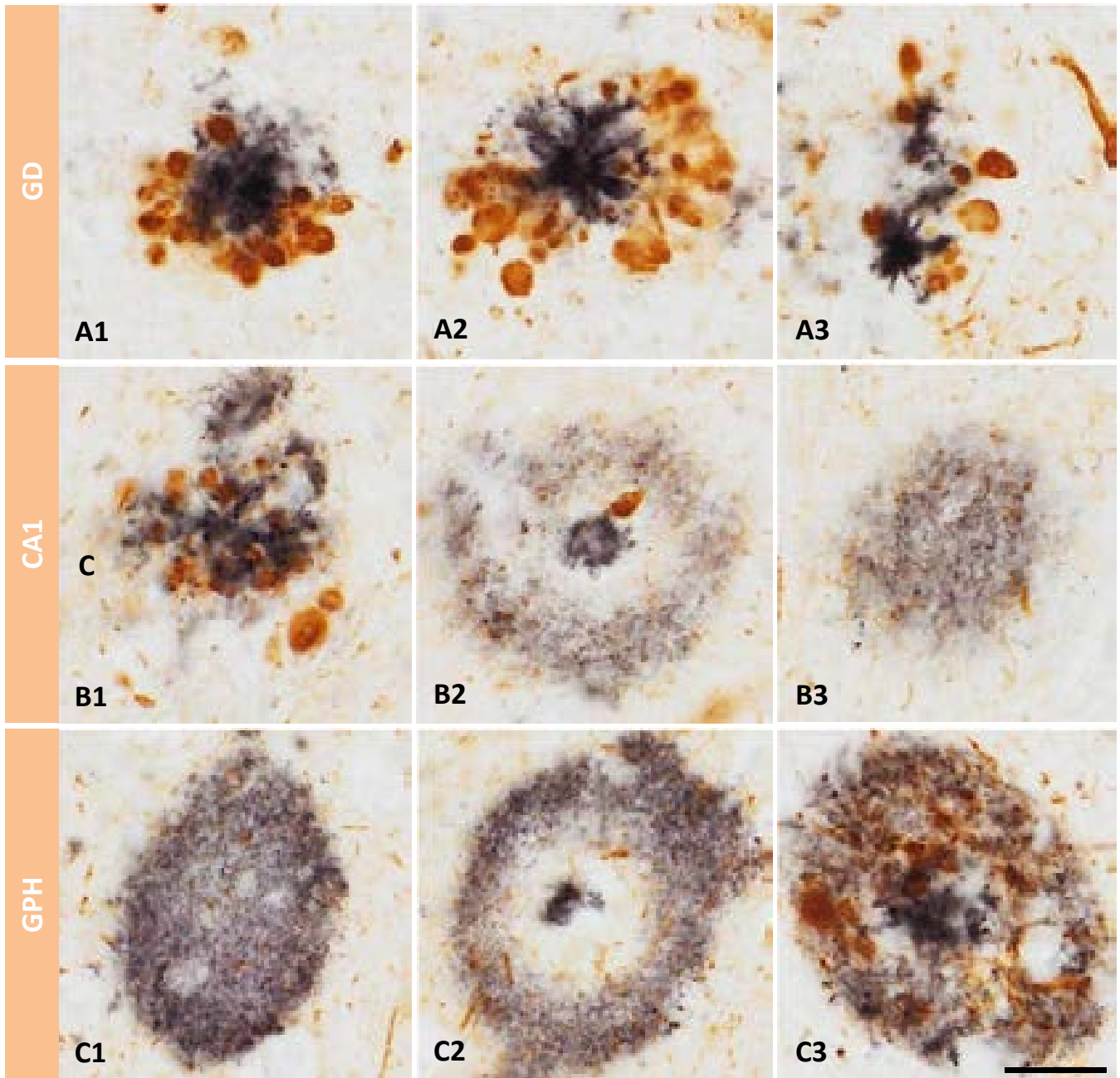


Figura 3.2.17. Análisis comparativo de los tipos de depósitos amiloides que se encuentran en diferentes regiones del hipocampo y giro parahipocampal de un caso Braak V-VI con moderada patología neurítica. Mediante inmunohistoquímica doble para 4G8 (azul oscuro) y AT8 (naranja) puede observarse la gran cantidad de neuritas distróficas positivas para fosfo-tau que rodean las placas del GD (ver detalles A1-A3). Las placas de A β de CA1 (B) y del GPH (C) presentan una mayor variabilidad (fibrilares, B1; clásicas, B2, C2 y C3; o difusas, B3 y C1), desarrollando en este individuo una menor proporción de neuritas distróficas asociadas (ver detalles B2 y C2). Barra de escala: 20 μ m.

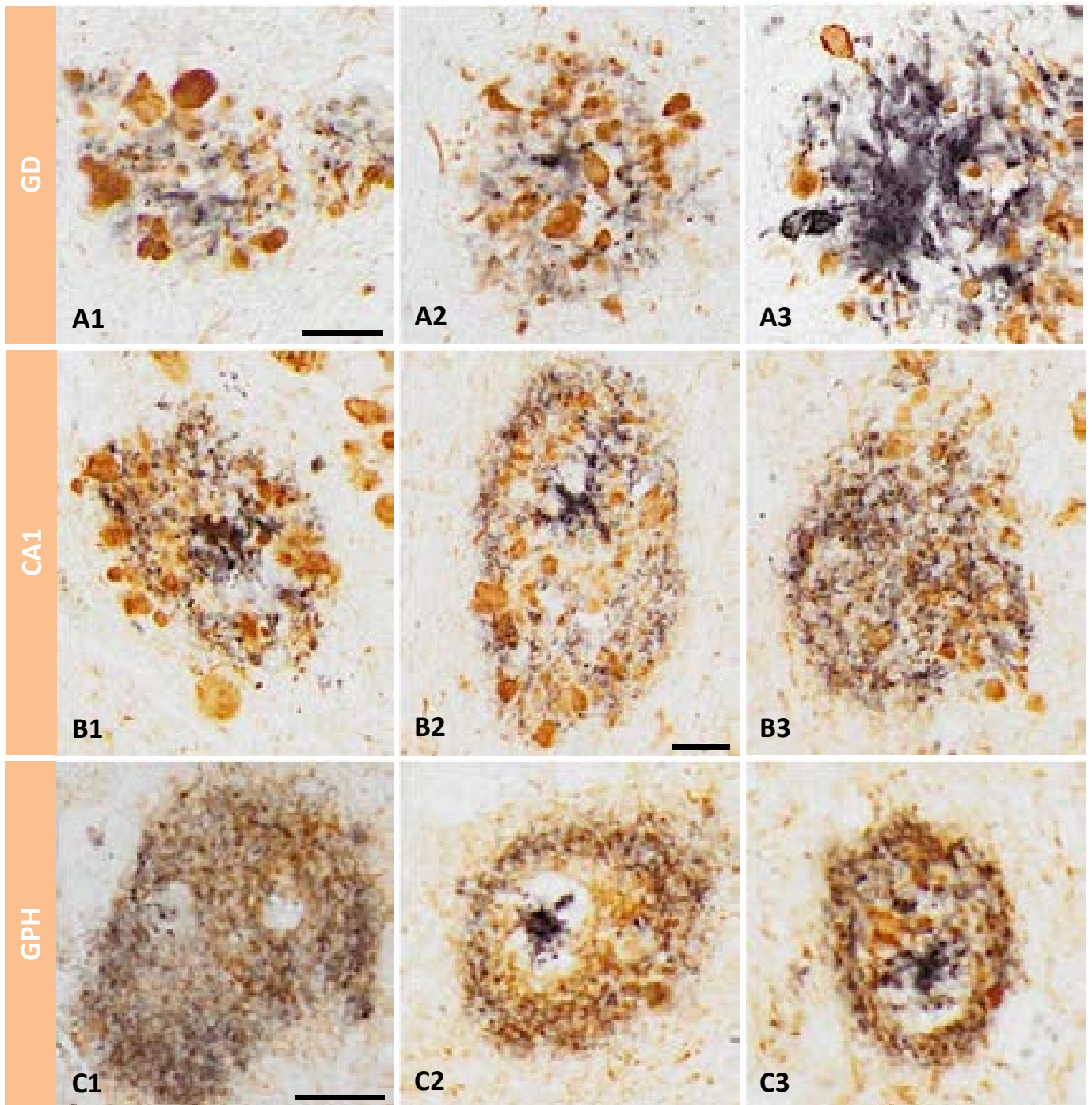


Figura 3.2.18. Análisis comparativo de los tipos de depósitos amiloides que se encuentran en diferentes regiones del hipocampo y giro parahipocampal de un caso Braak V-VI con abundante patología neurítica. Mediante inmunohistoquímica doble para 4G8 (azul oscuro) y AT8 (naranja) puede observarse, que al igual que en la figura anterior, una gran cantidad de neuritas distróficas positivas para fosfo-tau rodean siempre las placas del GD (ver detalles A1-A3). Las placas de A β de CA1 (B) y del GPH (C) presentan una mayor variabilidad (fibrilares, B1; clásicas, B2, B3, C2 y C3; o difusas, C1), desarrollando en este individuo una mayor proporción de neuritas distróficas. Barra de escala: 25 μ m.

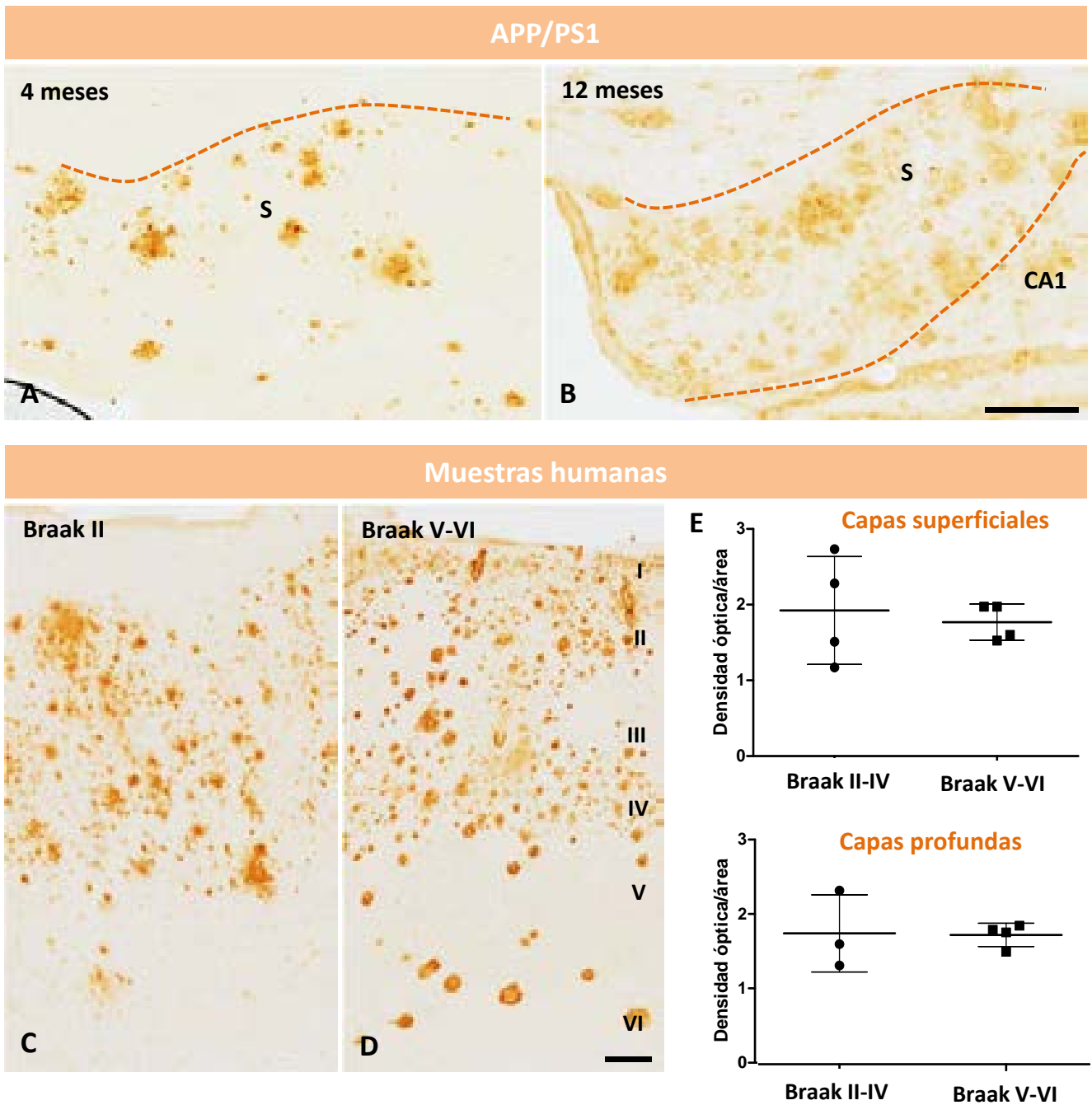
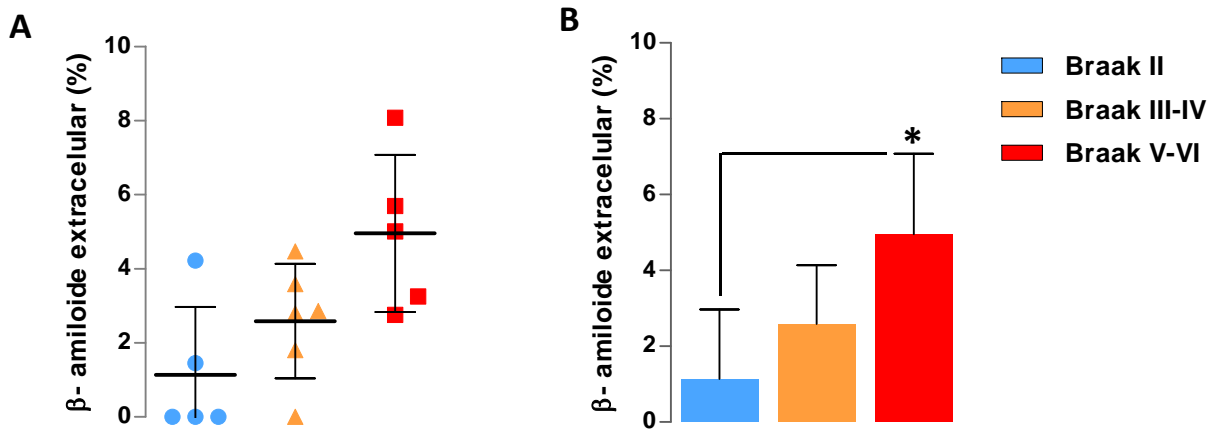


Figura 3.2.19. A diferencia de lo que ocurre en el modelo transgénico APP/PS1, el grado de compactación de los depósitos de A β de los pacientes de Alzheimer no cambia con la progresión de la enfermedad. Mediante inmunotinción para OC en el subículo de ratones APP/PS1 puede observarse que las placas amiloides son menos compactas a 12 meses (B) en comparación con los 4 meses de edad (A). Sin embargo, las imágenes de la corteza perirrinal de individuos dementes Braak V-VI (D) no muestran lo ocurrido en el modelo murino, siendo menos compactas las placas en los estadios más tempranos (C). E) El estudio cuantitativo de la densidad óptica de las placas demuestra que no hay cambios significativos en el grado de compactación de los depósitos extracelulares de A β a lo largo de la progresión de la enfermedad. Barra de escala: 200 μ m.



N=5-6; ADEVA de una vía; $F(2, 13)=5,578$; $P=0,018$; test de *Tukey*, * $p<0,05$.

Figura 3.2.20. La corteza peririnal de los pacientes dementes Braak V-VI presenta una mayor deposición amiloide extracelular. Pese a la gran variabilidad que presenta la patología amiloide en la corteza temporal de las muestras humanas analizadas en el estudio cuantitativo de la carga de A β (A), se produce un incremento significativo de los niveles de Abeta extracelular en la corteza peririnal de los pacientes Braak V-VI en comparación con aquellos individuos de la misma edad que se encuentran en los estadios iniciales de la enfermedad (Braak II) (B).

Alzheimer (Fig. 3.2.21). Los depósitos de A β en los ratones APP/PS1 presentaron siempre una morfología y composición similar, con independencia de la región analizada (Fig. 3.2.21 A1-A3 y F), y similar también con los depósitos que se formaron en el giro dentado de los casos Braak V-VI (Fig. 3.2.21 B1-B3 y G): placas con forma estrellada, compuestas mayoritariamente por el péptido A β 42, neuríticas, fibrilares y con un pequeño halo oligomérico alrededor. Las placas de CA1 de los pacientes de Alzheimer, en su mayoría clásicas y neuríticas, presentaron las siguientes características: núcleo denso, compacto y fibrilar, formado por A β 42, con un halo difuso alrededor no fibrilar (Fig. 3.2.21 C1-C3 y H). La corteza entorrinal (no mostrada) y perirrinal presentaron, además de placas clásicas y neuríticas (Fig. 3.2.21 D1-D3 y I), placas difusas: amorfas, difusas, no fibrilares y sin neuritas distróficas asociadas (Fig. 3.2.21 E1-E3 y J).

3.2.3. Angiopatía cerebral amiloide asociada a la enfermedad de Alzheimer

Como último apartado del estudio de la patología amiloide en las muestras humanas con neuropatología asociada a la enfermedad de Alzheimer, se analizó también la angiopatía cerebral amiloide (CAA) en los diferentes individuos Braak V-VI. Como se muestra en la figura 3.2.22, en la mayoría de las muestras de los casos dementes, el hipocampo (ver imagen A1 y A2 de la Fig. 3.2.22) y el giro parahipocampal (ver imagen B de la Fig. 3.2.22) desarrollaron una extensa patología amiloide asociada a los vasos sanguíneos. Mediante análisis inmunohistoquímico con OC, se observó una gran cantidad de A β depositado en la pared tanto de capilares (Fig. 3.2.22 A2, C y D), como de vasos sanguíneos de mayor calibre (Fig. 3.2.22 E-J). En algunas ocasiones, los vasos parecían colapsados (Fig. 3.2.22 A2, C, F y G), e incluso parecían presentar fracturas (Fig. 3.2.22 J). Además, se encontraron numerosos depósitos amiloides de tipo clásico, positivos para 4G8 y AT8, en el hipocampo (Fig. 3.2.23 A) y giro parahipocampal (Fig. 3.2.23 B) de pacientes dementes Braak V-VI, asociados íntimamente con la vasculatura (Fig. 3.2.23 B-D).

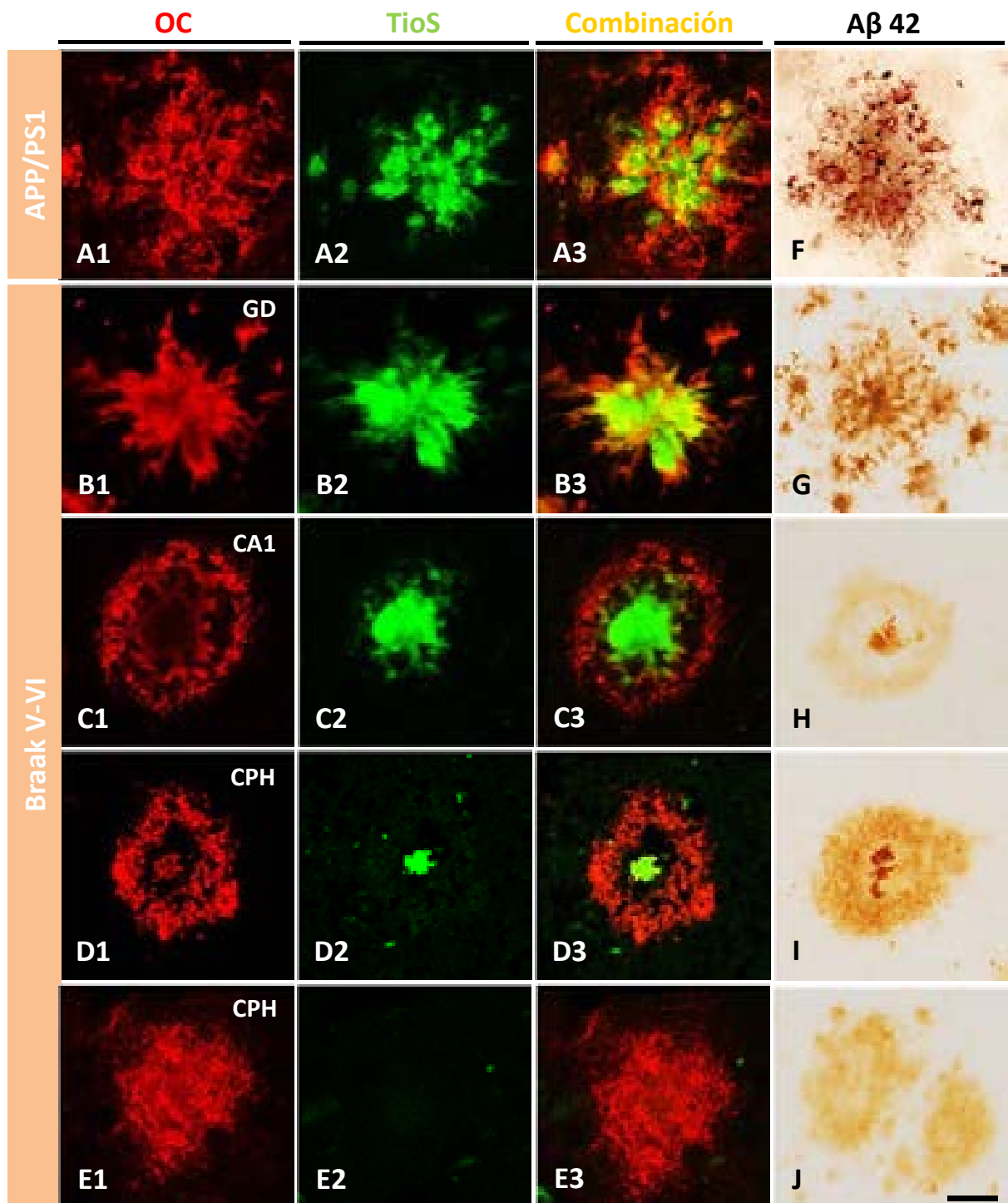


Figura 3.2.21. Estudio comparativo de los diferentes tipos de placas seniles entre ratones transgénicos APP/PS1 (A y F) y pacientes Braak V-VI (B-E, G-J) mediante doble marcaje fluorescente para OC y A β fibrilar (TioS) e inmunotinción para A β 42. Los depósitos amiloides que se desarrollan en el ratón APP/PS1 (A) presentan siempre una morfología y composición similar entre ellos, con independencia de la región analizada, y similar también con los depósitos que se forman en el giro dentado de pacientes Braak V-VI. (B): placas amorfas, compuestas mayoritariamente por A β 42, fibrilares con un pequeño halo oligomérico, muy compactas y neuríticas. Las placas de CA1 son del tipo clásico (C): núcleo denso compacto y fibrilar, formado por A β 42, con halo difuso alrededor no fibrilar, y neuríticas en su mayoría. La corteza perirrinal/entorrinal presenta además de placas clásicas y neuríticas, placas difusas (E): amorfas, difusas, no fibrilares y sin neuritas distróficas asociadas. Barra de escala: 25 μ m.

Angiopatía cerebral amiloide

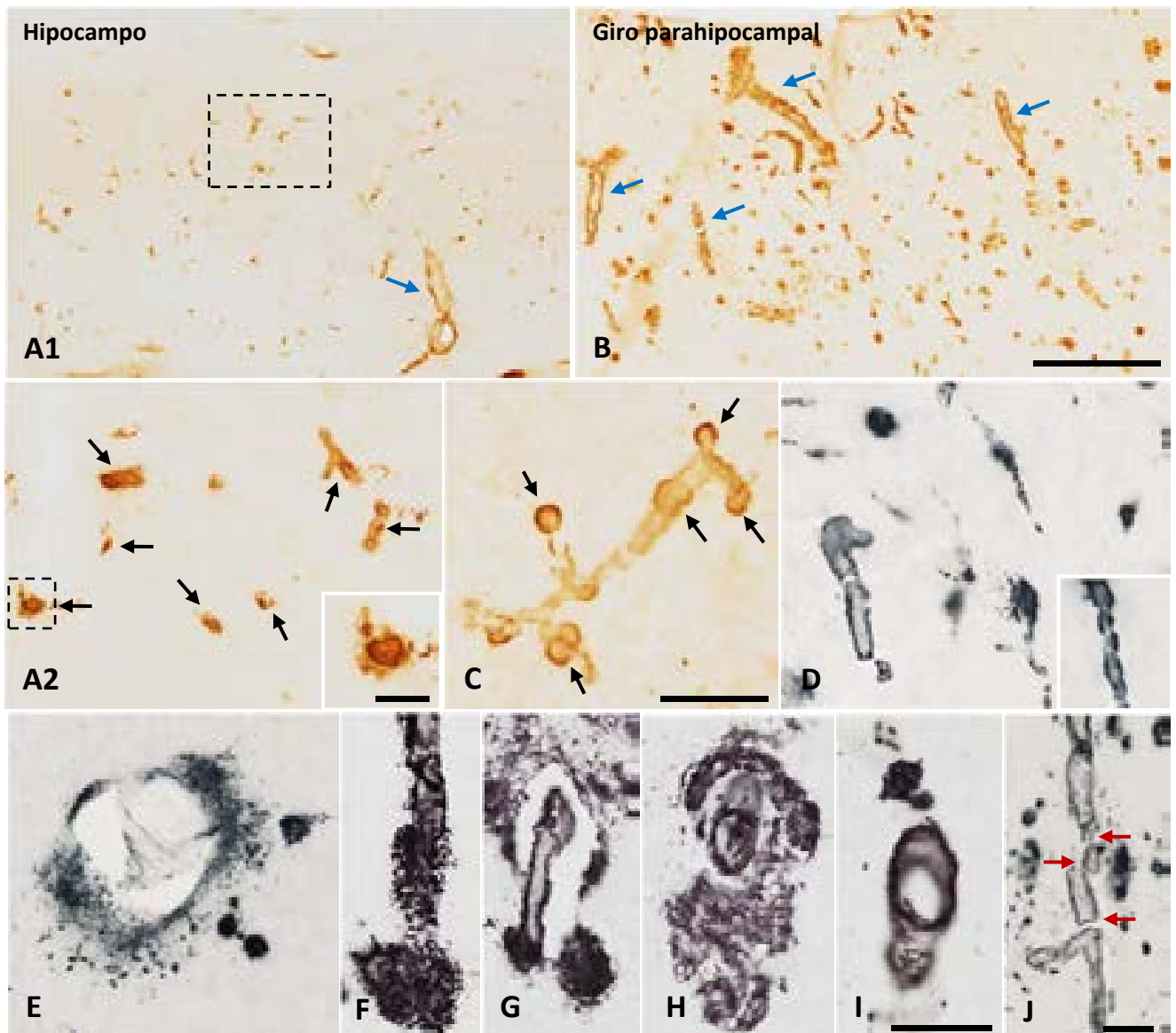


Figura 3.2.22. El hipocampo y giro parahipocampal de la mayoría de las muestras humanas Braak IV-VI desarrollan una severa angiopatía cerebral amiloide (CAA). Mediante inmunotinción para OC puede observarse una gran cantidad de A β depositado en la pared de los vasos (A1 y B, flechas azules indican vasos sanguíneos), afectando incluso a aquellos de menor calibre (capilares) (A2, flechas indican perfiles de capilares, ver detalle en inserto). En algunos individuos, los capilares se encuentran colapsados (flechas en C, inserto en D). Las imágenes de detalle E-J muestran diversos ejemplos de CAA tanto en hipocampo como GPH, en los que se observa como la deposición amiloide alrededor del vaso adquiere la apariencia de una placa senil. Las flechas rojas de la imagen J muestran fracturas vasculares. Barra de escala: A1-B: 500 μ m; A2-C: 50 μ m; inserto en A2 y en D: 25 μ m; D-J: 100 μ m.

Angiopatía cerebral amiloide

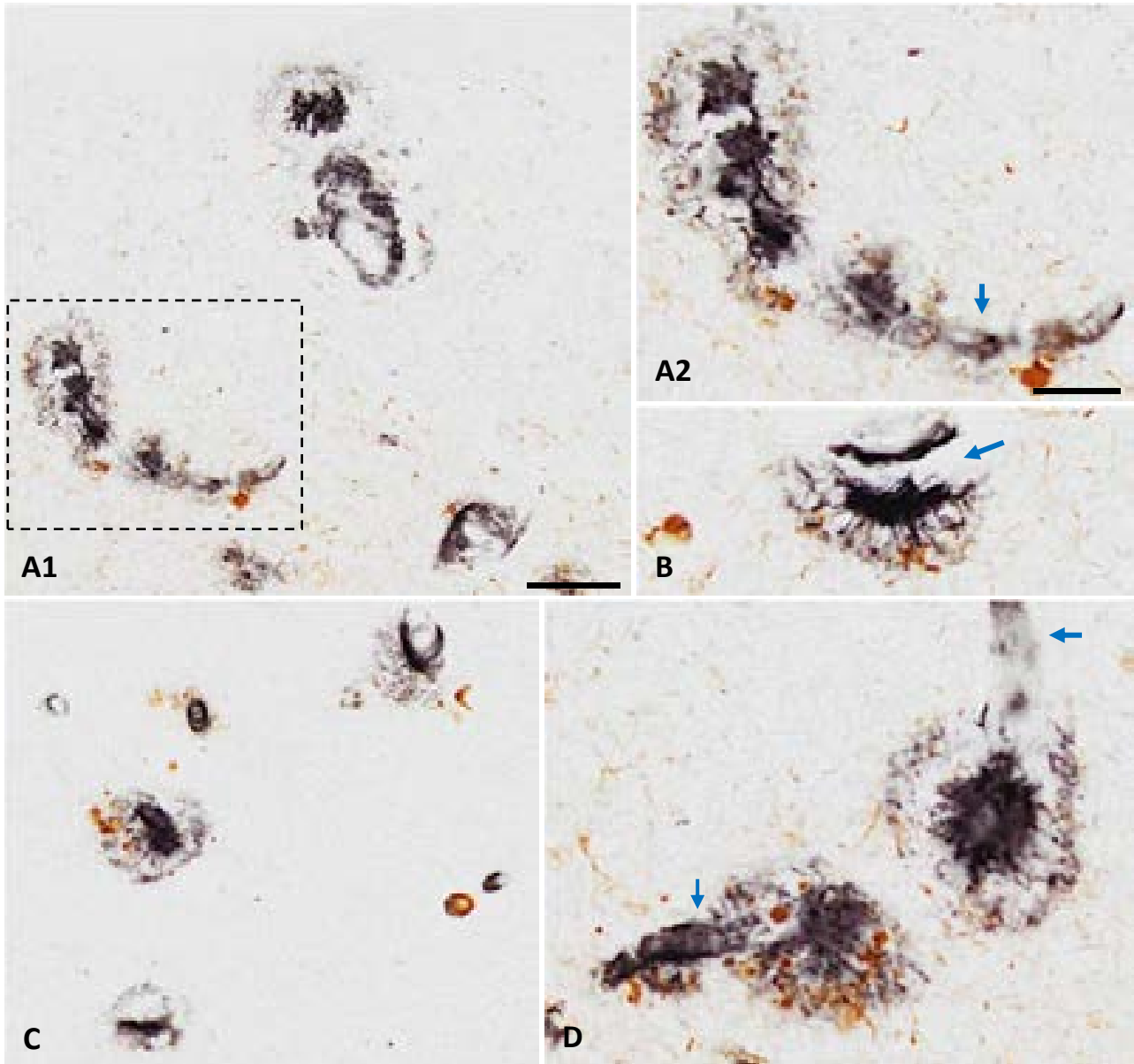


Figura 3.2.23. Placas neuríticas clásicas asociadas a los vasos sanguíneos. Inmunohistoquímica doble para 4G8 (azul oscuro) y AT8 (marrón) en el hipocampo (A) y giro parahipocampal (B, C y D) de pacientes dementes Braak V-VI.. En algunos individuos con Alzheimer se observan numerosos vasos positivos para 4G8 que desembocan o se asocian íntimamente con depósitos de A β de tipo clásico (flechas en A2, B y D indican vasos). Barras de escala: A1 y C: 50 μ m; A2, B y D: 25 μ m.

Capítulo 3.3.

REACTIVIDAD GLIAL EN EL HIPOCAMPO Y GIRO PARAHIPOCAMPAL DE MUESTRAS HUMANAS Y PROGRESIÓN DE LA PATOLOGÍA DEL ALZHEIMER

Otro de los rasgos patológicos de la enfermedad de Alzheimer es la existencia de un proceso inflamatorio caracterizado por la activación de células microgliales y astrogliales. Sin embargo, la función de esta glía activada en la progresión de esta enfermedad no es conocida. La visión dominante en la actualidad otorga un papel neurotóxico a la activación microglial y neuroprotector a los astrocitos. Esta visión está basada principalmente en estudios en modelos transgénicos de AD (Heneka et al. 2015). En concreto, en estos estudios se han utilizado sobre todo modelos que producen A β (modelos APP y APP/PS1) ya que los basados en tau presentan una activación glial muy limitada. Es por ello que el análisis de la respuesta inflamatoria en muestras humanas es esencial para, por un lado profundizar en el conocimiento de los mecanismos patogénicos asociados a la AD, y por otro comprobar si la reacción inflamatoria que tiene lugar en los pacientes es similar a lo descrito en modelos animales, con objeto de validar su uso en estudios preclínicos o bien aportar nuevos datos que permitan seleccionar y/o mejorar estos modelos para que mimeticen lo más fielmente posible la patología humana. Por este motivo, en este capítulo de resultados se analizó el proceso de activación glial (microglial y astrogial) así como su implicación en la progresión de la patología en muestras humanas desde estadios de Braak II a VI, y además se compararon estos resultados con los obtenidos en el modelo transgénico APP/PS1. Para este estudio se emplearon principalmente técnicas inmunohistoquímicas para marcadores específicos de ambas poblaciones gliales, estudios de microscopía láser confocal, así como análisis morfométricos y estereológicos. Estos datos se complementaron con estudios moleculares *in vitro*.

3.3.1. Limitada activación microglial asociada a las placas de A β en los pacientes de Alzheimer

En primer lugar, se determinó el patrón de distribución de las células microgliales en el hipocampo y giro parahipocampal a lo largo de la progresión de la enfermedad mediante un estudio inmunohistoquímico para Iba1 (marcador de células microgliales) con contratinción de violeta de cresilo (para ayudarnos a localizar la región analizada) (Fig. 3.3.1). Las células Iba1-positivas de los casos leves Braak II mostraron una distribución homogénea, manteniendo los cuerpos celulares una posición equidistante entre ellos (delimitando cada una las células un área de influencia o "dominio microglial") en las regiones analizadas, el giro dentado, CA1 y la corteza perirrinal del giro parahipocampal (Fig. 3.3.1 A, D y G, respectivamente). Cabe destacar la notable variación en la densidad de células microgliales de una región a otra (de mayor a menor: GD, CA1 y GPH) que se observó a nivel cualitativo. Además, como puede apreciarse en el inserto de la figura 3.3.1 (G), la microglía presentó un fenotipo típico quiescente o no activado. En los pacientes de Alzheimer (Braak V-VI), la densidad de las células Iba1-positivas disminuyó aparentemente (Fig. 3.3.1 C, F y I), especialmente en el giro dentado (Fig. 3.3.1 C). También, se observó un cambio en el patrón de

distribución en los individuos de estadio avanzado Braak V-VI, concentrándose la microglía en grupos o *clusters* (ver inserto en la figura 3.3.1 I) a la vez que dejaba áreas sin células Iba1-positivas alterándose el patrón espacial característico y provocando la pérdida de las áreas definidas como dominio microglial. Los casos en estadio moderado Braak III-IV (Fig. 3.3.1 B, E y H) se comportaron como los casos Braak II o bien como los Braak V-VI analizados, según el individuo.

Los diferentes fenotipos morfológicos de la microglía (activada y quiescente) encontrados en las muestras *post mortem* fueron caracterizados en detalle partir de las secciones inmunoteñidas con anti-Iba1 (Fig. 3.3.2). Las imágenes de detalle A-E de la figura 3.3.2 fueron obtenidas del hipocampo de individuos en estadio leve Braak II, y muestran ejemplos típicos de microglía quiescente o en estado de reposo: cuerpo celular y núcleo pequeños, muy ramificadas, con prolongaciones finas y largas, altamente arborizadas y dispuestas de forma aparentemente equidistante (Fig. 3.3.2 A y C). En ocasiones se visualizaban alineadas en paralelo a las dendritas apicales de las células piramidales, como ocurre en CA1 (Fig. 3.3.2 B). En la sustancia blanca, las células de la microglía mostraron un cuerpo más prominente y un menor número de ramificaciones (Fig. 3.3.2 D y E). Las imágenes de las células microgliales activadas fueron tomadas de pacientes de Alzheimer (Braak V-VI) y se caracterizaban por hipertrofia del cuerpo (Fig. 3.3.2 F), pérdida y acortamiento de las prolongaciones (Fig. 3.3.2 G) y formación de grupos (Fig. 3.3.2 H) asociados a los depósitos de β -amiloide (ver más adelante).

Para comprobar el estado activado de las agrupaciones microgliales asociadas a las placas amiloides se empleó el anticuerpo CD68, un marcador lisosomal sobreexpresado en las células microgliales activadas. Como se observa en la figura 3.3.3 (B1), el giro dentado de los individuos Braak V-VI mostró únicamente inmunotinción para CD68 en las agrupaciones de células asociadas al A β (ver detalle ampliado en la figura 3.3.3 B2). Sin embargo, la inmunorreactividad para CD68 fue prácticamente imperceptible en el giro dentado de los casos leves Braak II (Fig. 3.3.3 A1, ver detalle ampliado en A2), en concordancia con la virtual ausencia de placas amiloides en esta región de estos individuos. El estudio mediante epifluorescencia corroboró que las células CD68 (Fig. 3.3.3 C2) eran también células microgliales Iba1-positivas (Fig. 3.3.3 C1).

La región CA1 presentó el mismo patrón de inmunotinción para CD68 que el giro dentado (Fig. 3.3.4). Las muestras humanas Braak II (Fig. 3.3.4 A1, detalle ampliado en A2) mostraron un escaso marcaje en comparación con el obtenido en los pacientes dementes Braak V-VI (Fig. 3.3.4 B1, detalle ampliado en B2). La serie de imágenes de la figura 3.3.4 C1-C3 muestra como la inmunorreactividad para CD68 se localizó fundamentalmente en agrupaciones de microglía relacionadas aparentemente con los depósitos de β -amiloide.

Todos estos datos indican que durante la progresión de la patología, los pacientes desarrollan un proceso de activación microglial en paralelo con la acumulación extracelular de A β .

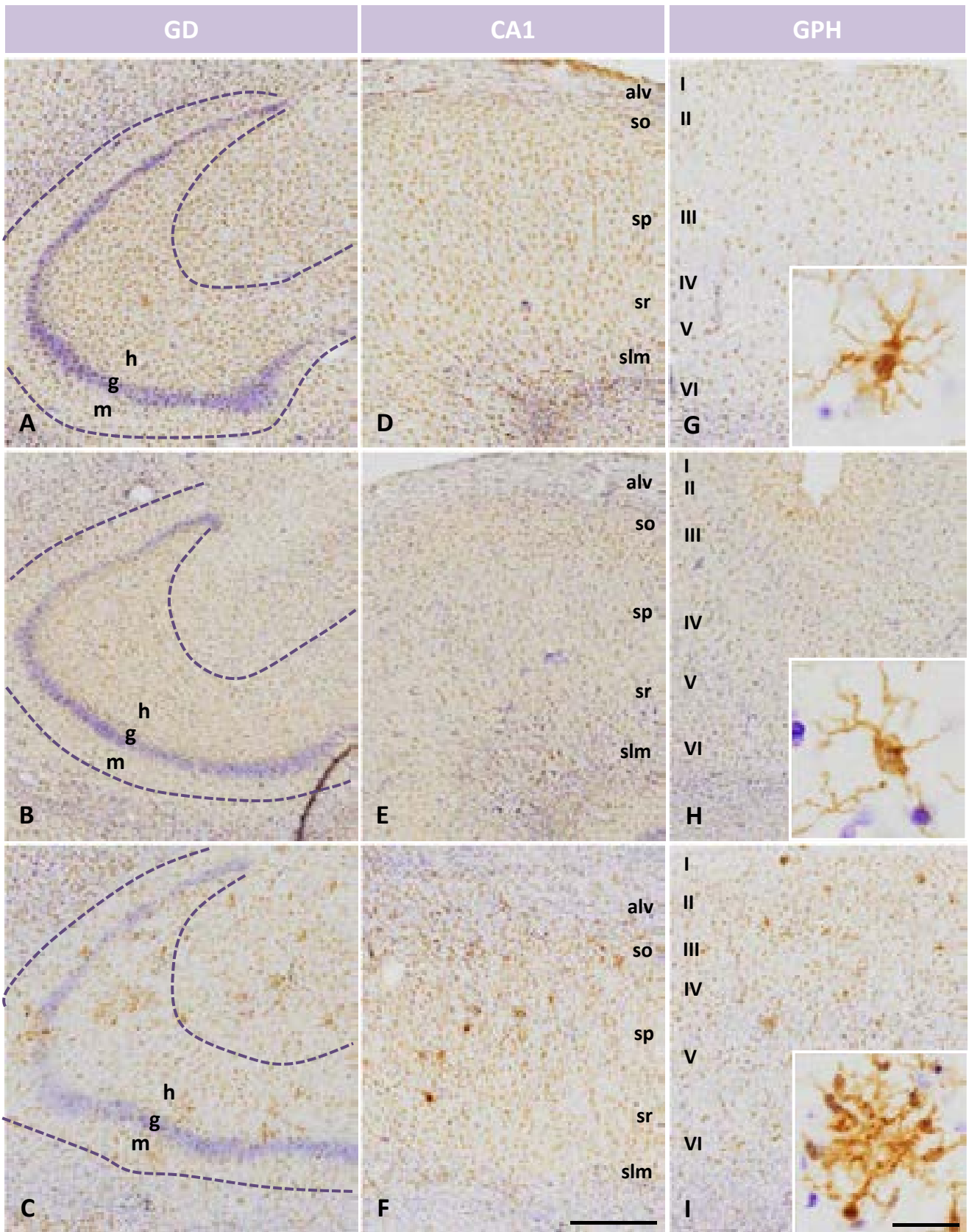
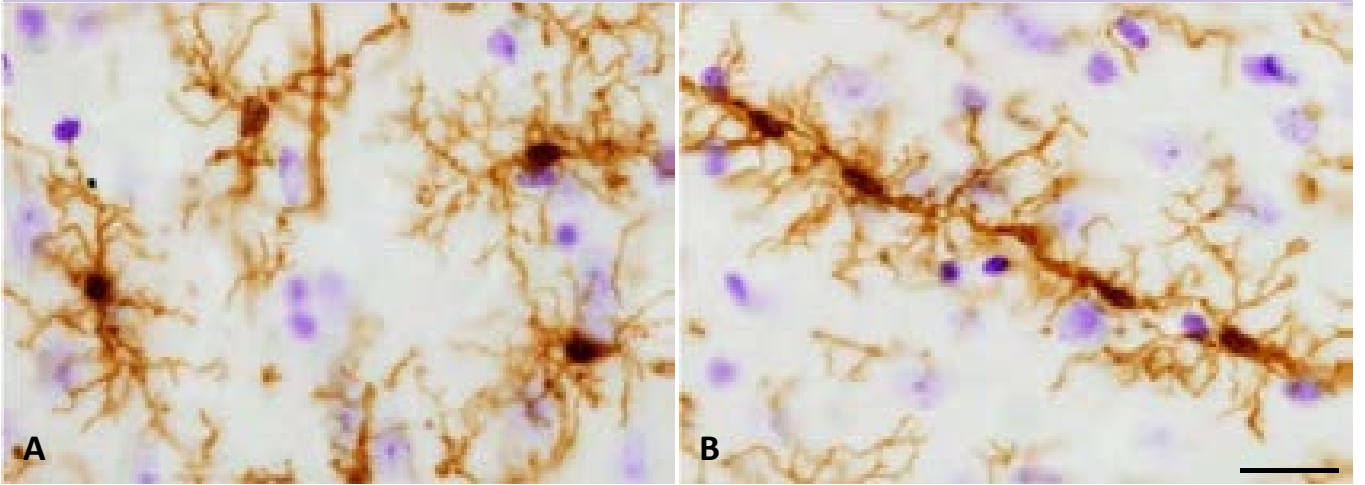
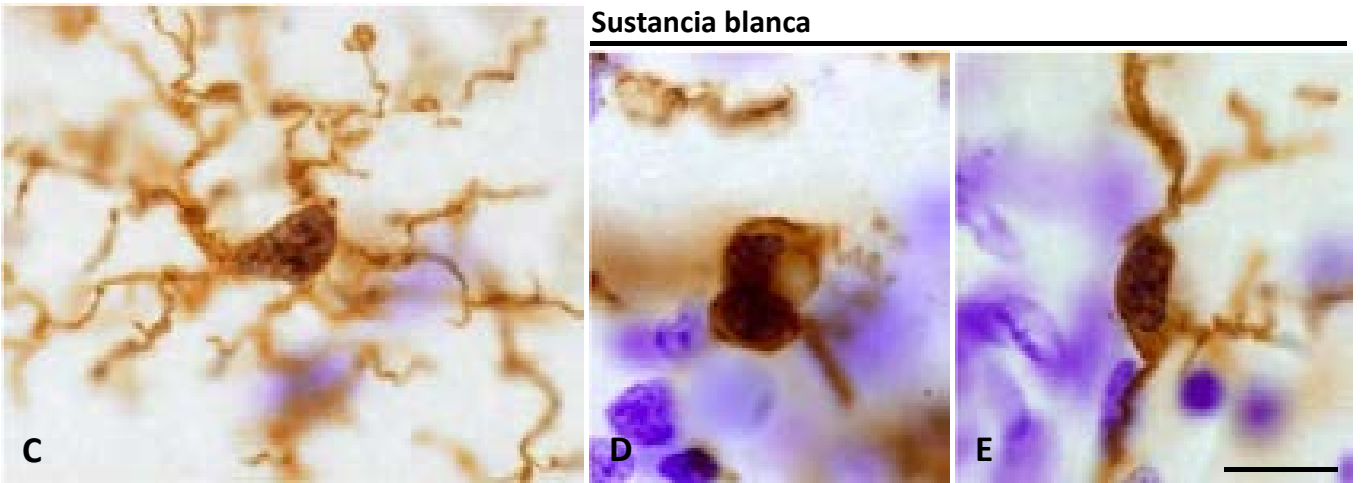


Figura 3.3.1. Patrón de distribución de las células microgliales en el GD (A-C), CA1 (D-F) y GPH (G-I) a lo largo de los estadios de Braak. El estudio inmunohistoquímico para Iba1 (contratinción con violeta de cresilo) muestra como las células microgliales de los individuos Braak II se distribuyen homogéneamente y de manera equidistante en las regiones analizadas, aunque la densidad de células varía de una zona a otra (GD>CA1>GPH) (A, D y G, respectivamente). Además estas células exhiben un fenotipo típico no reactivo (inserto en G). La densidad de las células Iba1 tiende a disminuir en los individuos de estadio avanzado Braak V-VI, (C, F y I) especialmente en el GD (C). Además, el patrón de distribución de la microglía cambia, concentrándose ésta en *clusters* (ver inserto en I) y dejando áreas sin inmunoreactividad. Los casos de estadios intermedios (B, E y H) se comportan como los analizados en Braak II o Braak V-VI según el individuo. *m*: capa molecular; *g*: capa granular; *h*: capa polimórfica o hilio. *alv*: alveus; *so*: stratum oriens; *sp*: stratum piramidale; *sr*: stratum radiatum; *slm*: stratum lacunosum-moleculare. Barra de escala: A-I: 500 µm; insertos en G,H e I: 20 µm.

Microglía quiescente



Sustancia blanca



Microglía activada

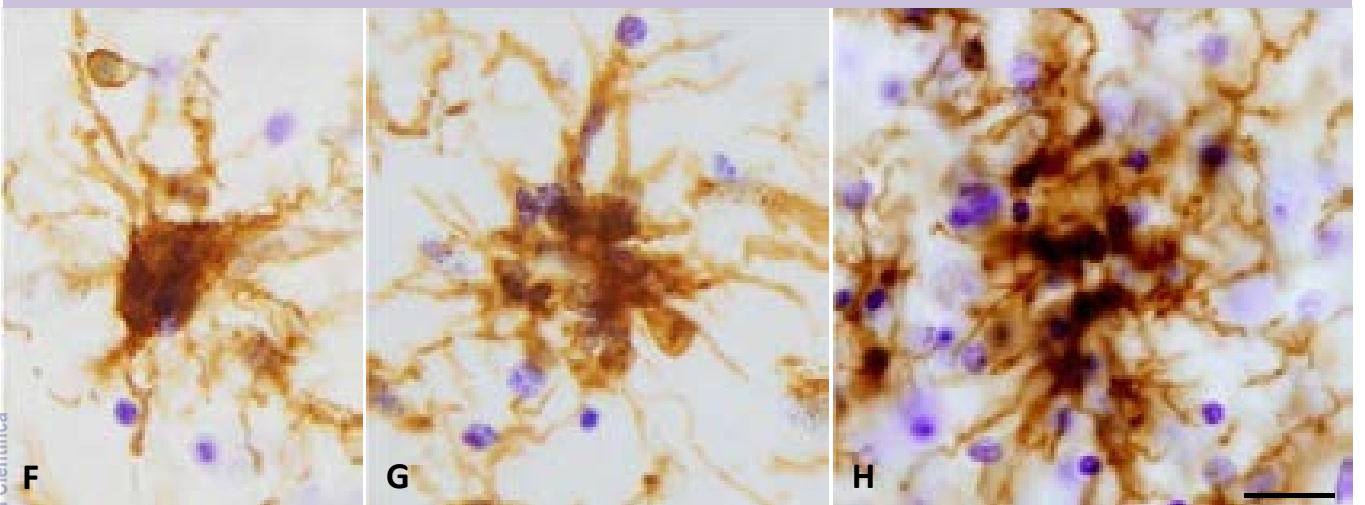


Figura 3.3.2. Estudio morfológico de los diferentes fenotipos microgliales (estado quiescente: A-E, y estado activado: F-H), hallados en las muestras humanas analizadas. Inmunohistoquímica para Iba1 y contratinción con violeta de cresilo. Las imágenes de detalle A-C muestran ejemplos de células microgliales típicas del hipocampo, con núcleos pequeños y una gran cantidad de ramificaciones muy arborizadas, dispuestas equidistantes de manera aleatoria (A y C) o alineadas en paralelo a las dendritas apicales de las células piramidales de CA1 (B). En la sustancia blanca, las células Iba1-positivas muestran un cuerpo celular más grande y un menor número de prolongaciones (D y E). En las imágenes de células microgliales activadas, que fueron tomadas de individuos Braak IV-VI, se observa hipertrofia del cuerpo (F), pérdida y acortamiento de las prolongaciones (G), y agrupaciones microgliales H), seguramente asociadas a las placas de A β . Barra de escala: A y B, F-H: 20 μ m; C-D: 10 μ m.

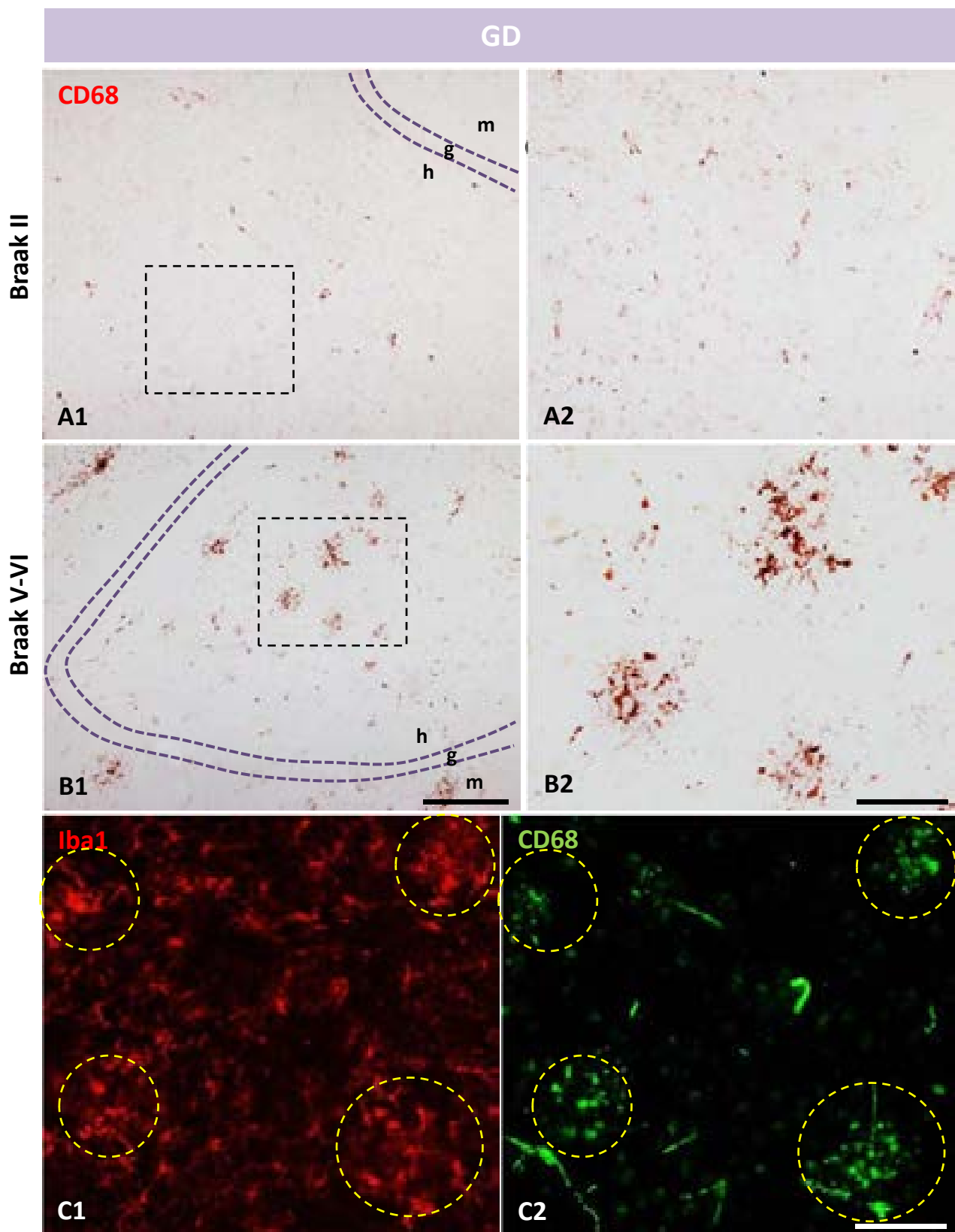


Figura 3.3.3. Las agrupaciones de células microgliales activadas asociadas a las placas son positivas para el marcador CD68. Inmunohistoquímica para CD68 en el GD de individuos en estadio Braak II (A) y en estadios más avanzados de la enfermedad, Braak V-VI (B). Únicamente la microglía asociada a los depósitos de $A\beta$ es inmunorreactiva para el marcador CD68 (detalle ampliado en B2). Las imágenes de epifluorescencia corroboran que las células CD68 (C2) son células microgliales positivas también para Iba1 (C1). *m*: capa molecular; *g*: capa granular; *h*: capa polimórfica o hilio. Barra de escala: A1, A2 y B1: 500 μ m; B2: 200 μ m; C1 y C2: 50 μ m.

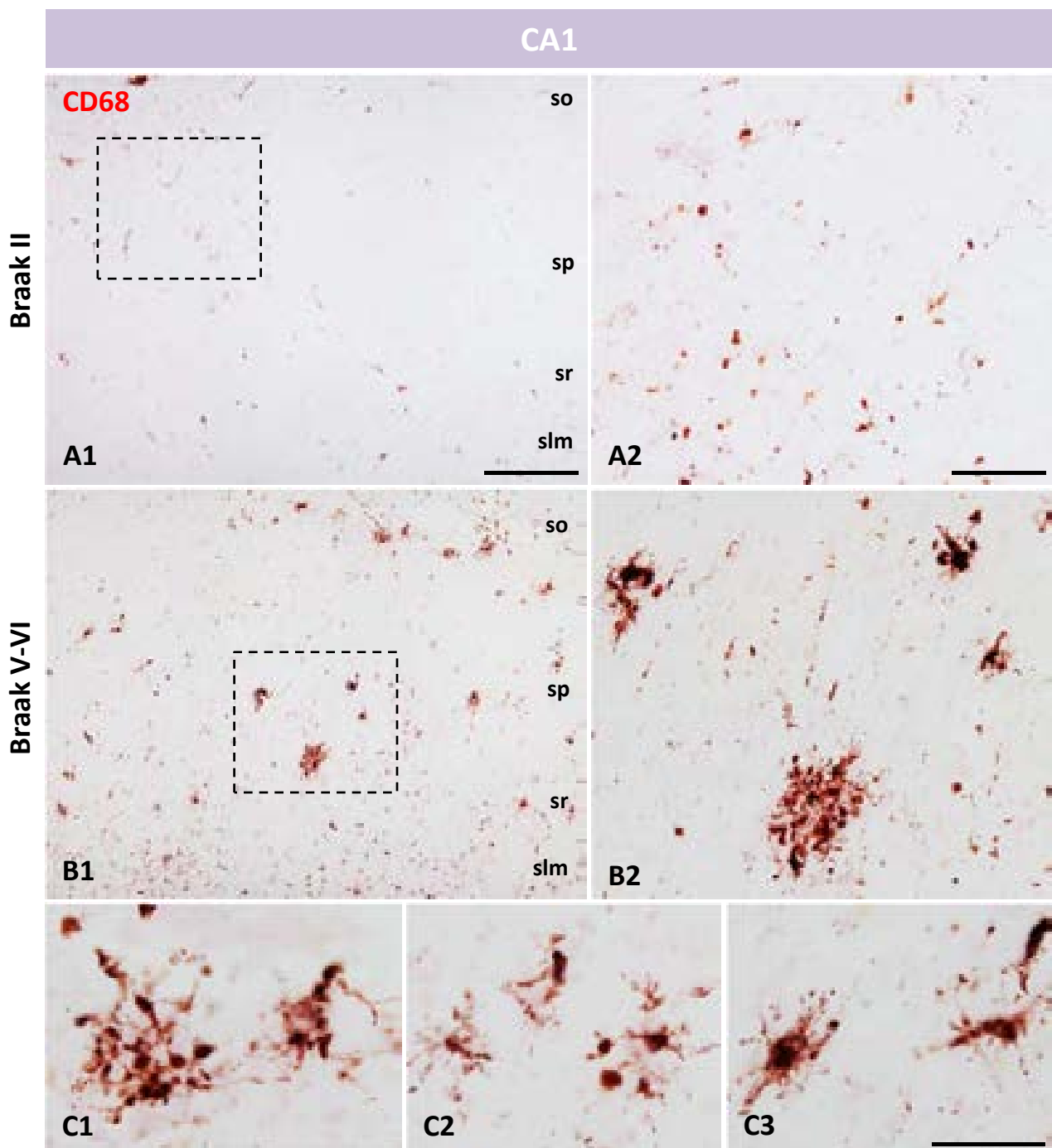


Figura 3.3.4. Las agrupaciones de células microgliales activadas asociadas a las placas de la región hipocampal CA1 son positivas para el marcador CD68. Inmunohistoquímica para CD68 en la región CA1 de individuos en estadio leve Braak II (A) y en individuos dementes (B). La región CA1 de las secciones Braak II (A1) muestran una leve inmunorreactividad (detalle ampliado en A2) en comparación con la que se obtiene en la misma región de los casos con Alzheimer (B1, detalle ampliado en B2). Al igual que ocurre en el GD, en CA1 la marca positiva para CD68 se acumula fundamentalmente en los depósitos de A β (ver ejemplos en los detalles C1-C3). *so*: *stratum oriens*; *sp*: *stratum pyramidale*; *sr*: *stratum radiatum*; *slm*: *stratum lacunosum-moleculare*. Barra de escala: A1-B1: 500 μ m; A2-B2: 200 μ m; C1-C3: 50 μ m.

Las secciones de hipocampo y giro parahipocampal de un caso control, no demente, con una severa neuroinflamación, permitieron comprobar que los marcadores Iba1 y CD68 se sobreexpresan en la microglía reactiva (Fig. 3.3.5). Las células Iba1-positivas se localizaron por todo el parénquima del giro dentado de este individuo (Fig. 3.3.5 A1) exhibiendo un claro fenotipo reactivo con hipertrofia celular y acortamiento/engrosamiento de las prolongaciones (Fig. 3.3.5 A2 y A3). Asimismo, la región CA1 presentó una importante inmunorreactividad para CD68 (Fig. 3.3.5 B1, ver detalle de célula activada en B2). Por último, y como era de esperar, el marcaje doble inmunofluorescente demostró que las células que sobreexpresaban CD68 eran células microgliales Iba1-positivas (Fig. 3.3.5 C).

Todos estos resultados indican que durante la progresión de la patología, los pacientes desarrollan un proceso de activación microglial en paralelo con la acumulación extracelular de A β .

En apoyo a los estudios inmunohistoquímicos se analizaron los niveles de expresión de ARNm de diversos marcadores microgliales mediante RT-PCR en colaboración con el laboratorio del Dr. Javier Vitorica (Figura suplementaria 3.4). En concreto, se analizaron Iba1 y CD11b como marcadores generales de la microglía, y además CD45 y CD68 como marcadores de activación. Los niveles de expresión mostraron un incremento significativo para CD45 (Fig. suplementaria 3.4 A) y CD68 (Fig. suplementaria 3.4 B) en el hipocampo y giro parahipocampal de los pacientes Braak V-VI en comparación con los individuos control, y los casos Braak II y Braak III-IV. Además, ambos marcadores presentaron una correlación positiva a lo largo de toda la patología (Fig. suplementaria 3.4 C). No obstante, los niveles de ARNm de CD11b e Iba1 no mostraron cambios significativos con la progresión de los estadios de Braak, aunque sí una tendencia a aumentar (Fig. suplementaria 3.4 D y E, respectivamente).

Estos datos apoyan la existencia de un proceso de activación microglial moderado en las muestras humanas y que aumenta con la progresión de la enfermedad. Además, la correlación entre CD68 y CD45 es congruente con la posibilidad de que la microglía activada observada sea de origen periférico (macrófagos infiltrados). Este punto se tratará de dilucidar más adelante.

3.3.2. Estrecha interacción de la microglía activada con los depósitos de A β indicando un posible papel fagocítico y/o en la formación/compactación de las placas

Para poder analizar en detalle la relación microglía/A β en aquellos individuos Braak IV-VI en los que se observó previamente agrupación de las células Iba1-positivas, se realizó una doble inmunotinción para A β (4G8) y microglía (Iba1). Como se muestra en la serie de imágenes A1-A4 de la figura 3.3.6, la mayoría de las células microgliales que rodeaban las placas en el hipocampo presentaron marcaje de A β intracelular (ver inserto de la figura 3.3.6 A2 y detalles ampliados en la figura 3.3.6 B y C). Los depósitos amiloides de esta región, de menor tamaño y densidad, permitieron la observación de numerosas células microgliales con A β intracelular en el interior de la placa (Fig. 3.3.6 D y E). Además, este amiloide 4G8-positivo se acumuló tanto en el cuerpo celular como en las prolongaciones microgliales (Fig. 3.3.6 F). Estos resultados apoyan un posible papel fagocítico de la

microglía activada que rodea las placas, aunque también apuntan la posibilidad de un papel directo en la formación/compactación de las placas. En relación con esto último, la serie de imágenes A1-A4 que se muestra en la figura 3.3.7, obtenidas de secciones de un mismo individuo Braak IV, ilustran un hipotético proceso temporal de formación de los depósitos extracelulares con la participación activa de las células Iba1-positivas. De tal modo que, en lo que consideramos las fases iniciales de formación de la placa (Fig. 3.3.7 A1 y A2) se aprecia claramente un acúmulo muy laxo de amiloide extracelular con aspecto fibrilar rodeado de células microgliales con una gran cantidad de péptido A β en su interior. Las células microgliales podrían estar participando en la fibrilización del A β extracelular ayudando a formar placas cada vez más compactas con el tiempo. Detalles de la presencia de A β intracelular en la microglía asociada a placas se ilustra en la figura 3.3.7 (B y C). En las fases más avanzadas de la formación de estas placas, se observan depósitos ya muy compactos con gran cantidad de fibras de A β , es posible observar que están rodeadas por una menor cantidad de microglía con marcaje 4G8 en su interior (Fig. 3.3.7 A3 y A4). Esta interpretación de las imágenes obtenidas en muestras humanas apoyaría un papel protector de la microglía, concentrando A β en las placas y así evitar su difusión por el parénquima y por tanto el efecto tóxico sobre las neuronas circundantes.

Además, se realizaron múltiples estudios de microscopía láser confocal para continuar profundizando en la relación de la microglía reactiva con las placas de A β , especialmente en aquellas ocasiones en las que la interacción se producía en el interior de los depósitos amiloides, para así salvar las limitaciones de la microscopía de campo claro. El hipocampo y el giro parahipocampal de aquellos individuos Braak IV y Braak V-VI que presentaron una alta proporción de placas neuríticas, exhibieron células microgliales con fenotipo activado, localizadas en el interior de los depósitos amiloides y rodeando (compactando y/o fagocitando) el núcleo fibrilar de A β (Fig. 3.3.8 A-D). Se llevaron a cabo reconstrucciones pseudo-3D de las series de imágenes confocales tomadas para comprobar que, efectivamente, las células Iba1 se encontraban rodeando íntimamente el material amiloide compacto central (Fig. 3.3.8 E y G2). Asimismo, se tomaron fotografías de diferentes planos confocales de un mismo depósito de A β fibrilar (Fig. 3.3.8 G1-G4) y se observó un íntimo contacto entre éste y varias células microgliales. Esto podría estar indicando una posible interacción compactación/fagocítica, ya observada previamente.

Por último, se encontraron numerosos ovillos neurofibrilares extracelulares, o *ghost tangles*, envueltos por la microglía, mostrando una interacción semejante, como se aprecia en la imagen doble inmunofluorescente para Iba1 y AT8 (Fig. 3.3.8 F).

Por consiguiente, los depósitos de A β que fueron reactivos para las células microgliales (con distrofias APP-positivas asociadas) presentaron dos tipos de relación con la microglía, 1) placas que fueron rodeadas por la microglía, encontradas mayoritariamente en el giro dentado y subículo de individuos Braak IV y Braak V-VI (ejemplos en la figura 3.3.9 A-C), y 2) placas infiltradas por la microglía, rodeando y/o fagocitando el núcleo fibrilar (Fig. 3.3.9 D-F). Estas últimas se observaron

Control con neuroinflamación

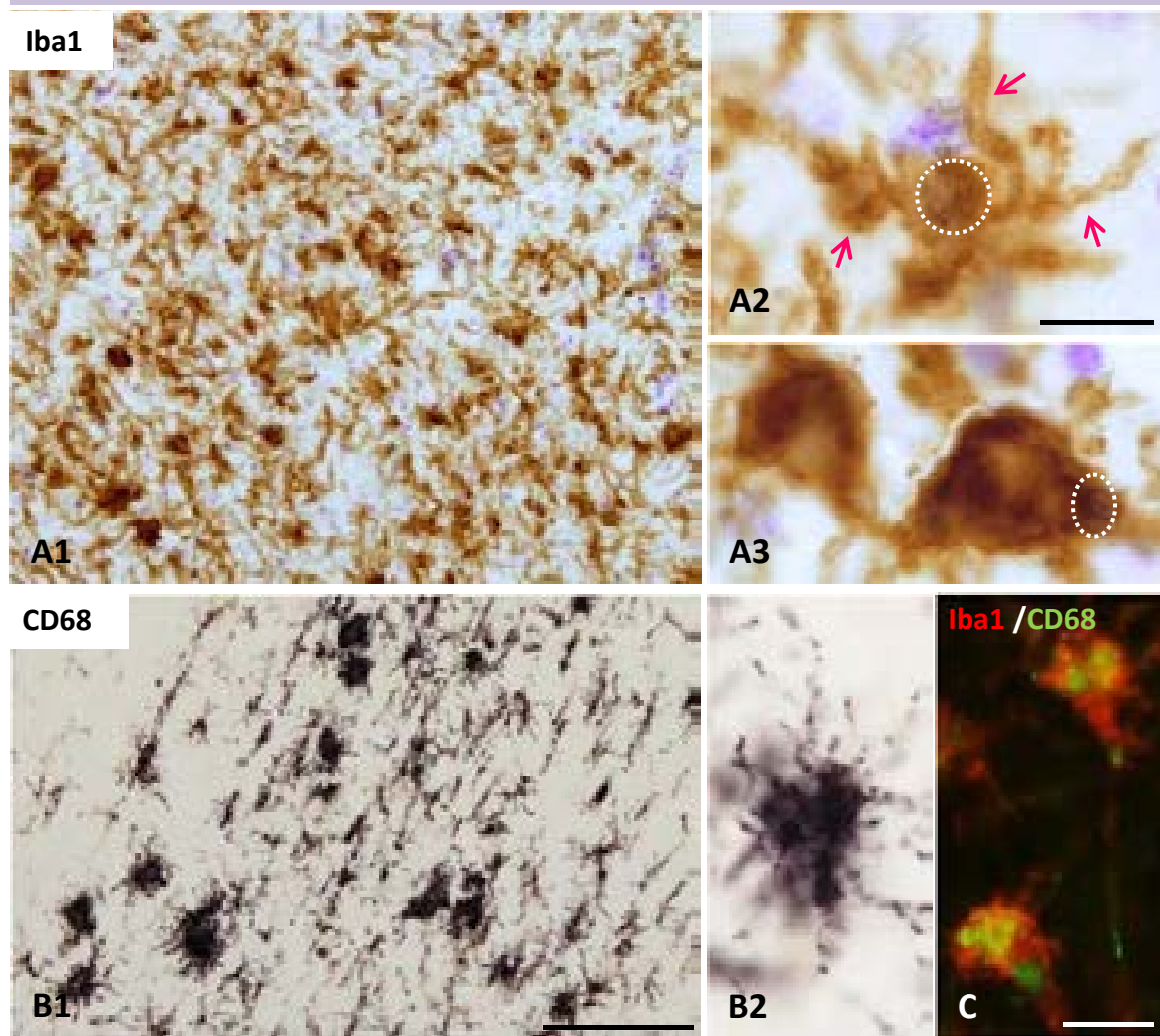


Figura 3.3.5. Iba1 y CD68 se sobreexpresan en la microglía reactiva. Inmunohistoquímica para Iba1 (A) y CD68 (B) en el hipocampo de un caso control, no demente, con una extensa neuroinflamación. Las células Iba1-positivas, que se extienden ocupando todo el parénquima nervioso (A1), exhiben un claro fenotipo activado: hipertrofia celular y acortamiento/ensanchamiento de las prolongaciones (detalles ampliados en A2 y A3, flechas indican prolongaciones microgliales y los círculos la región del núcleo). La región CA1 de este individuo presenta también una gran inmunorreactividad para el anticuerpo CD68 (B1, detalle de célula activada en B2). La imagen de epifluorescencia combinada muestra que las células que sobreexpresan CD68 (verde) son células microgliales Iba1 positivas (rojo) (C). Barra de escala: A1-B1: 100 μ m; A2-A3: 10 μ m; B2-C: 10 μ m.

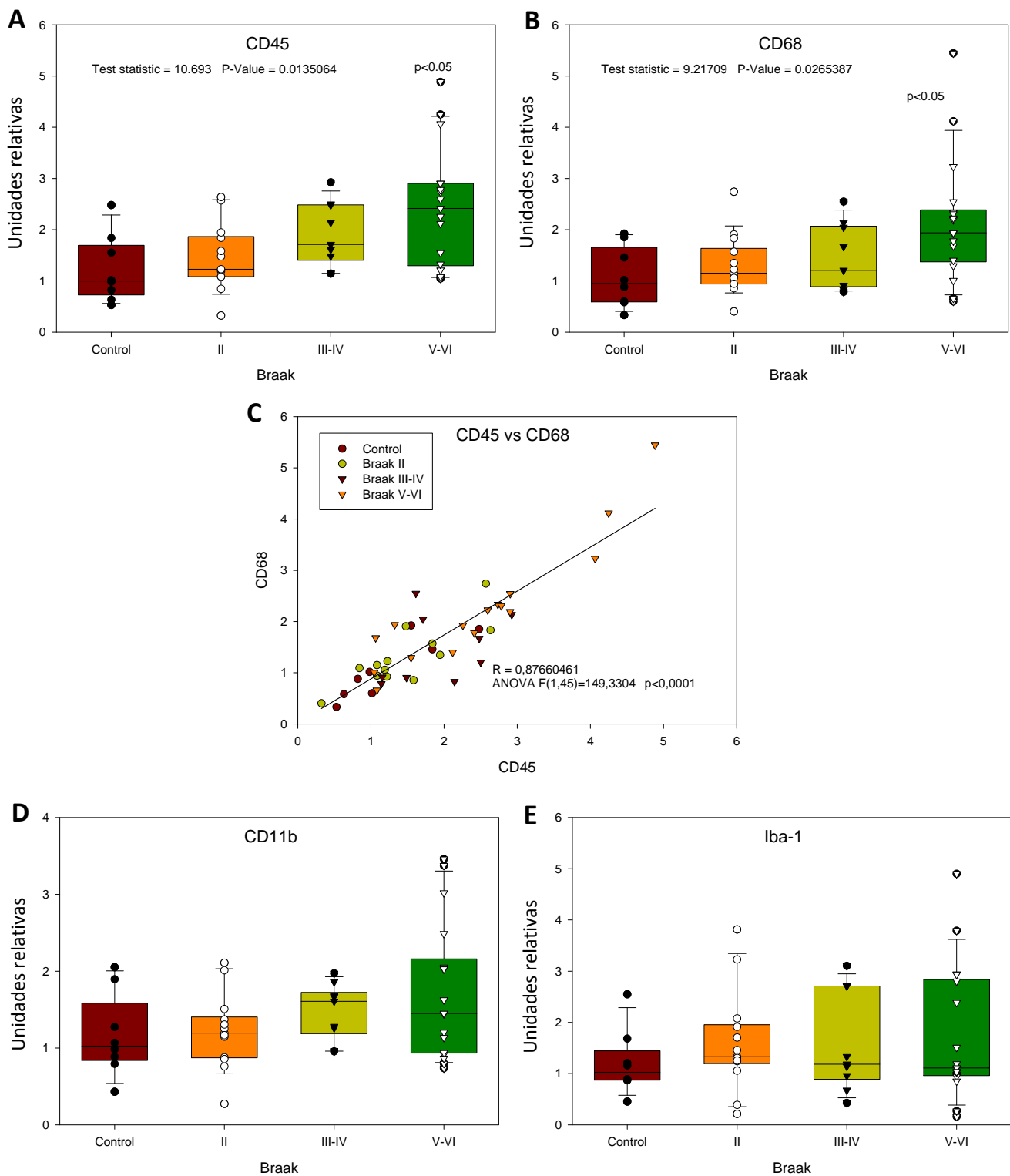


Figura Suplementaria 3.4. Análisis cuantitativo de la expresión de ARNm de marcadores generales de microglía (CD11b e Iba1) y marcadores específicos de activación (CD45 y CD68). Los niveles de expresión medidos por PCR muestran un incremento significativo de CD45 (A) y CD68 (B) en el hipocampo y GPH de pacientes Braak V-VI y presentan una correlación positiva (C) a lo largo de toda la patología. Sin embargo, CD11b (D) e Iba1 (E) no exhiben diferencias significativas, aunque sí una tendencia a aumentar, con la progresión del estadio de Braak. Resultados obtenidos en colaboración con el Dr. Javier Vitorica de la Universidad de Sevilla.

Microglía/A β

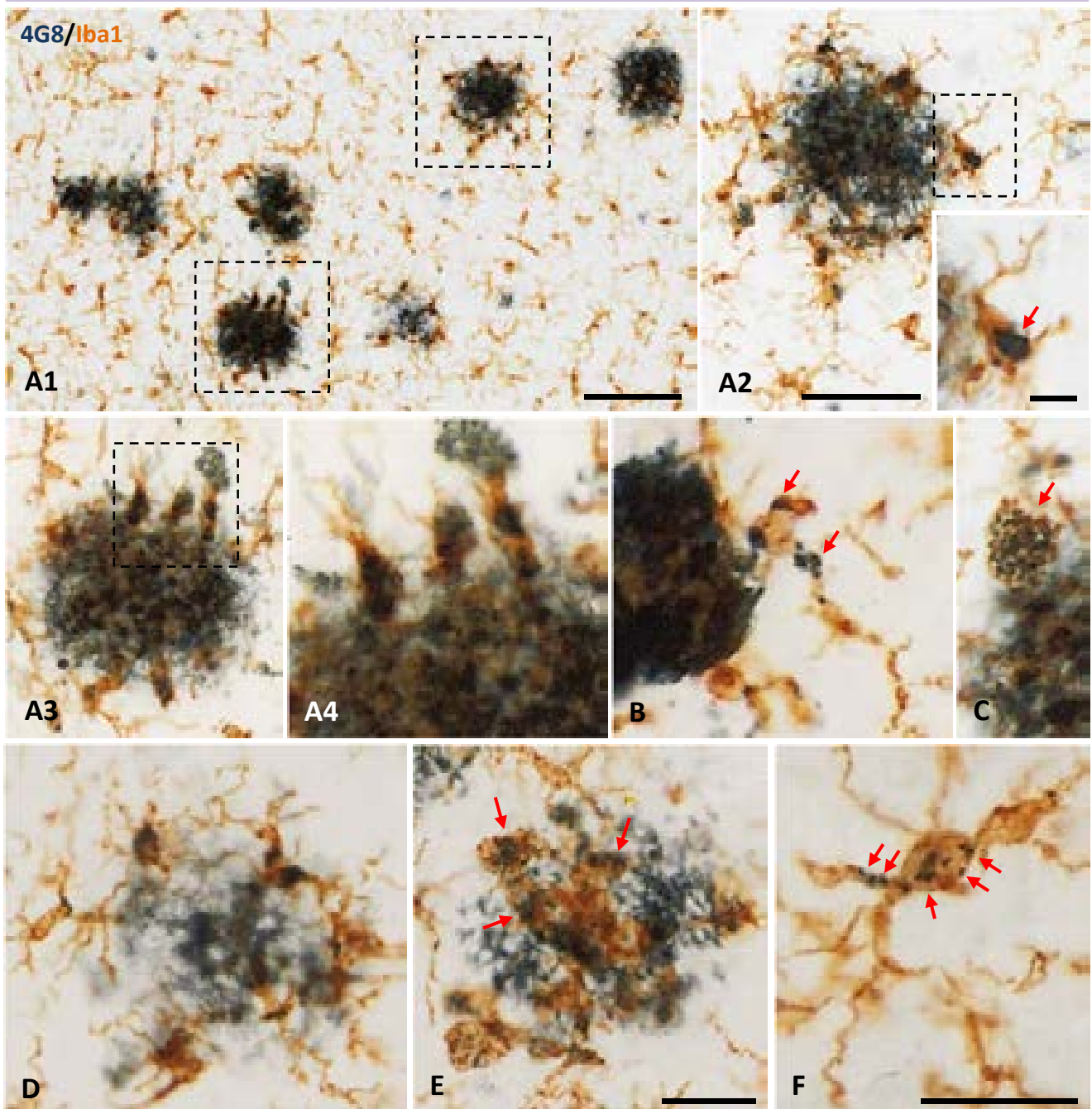


Figura 3.3.6. Las células microgliales reactivas que se encuentran asociadas a las placas presentan A β en su interior, indicando una posible actividad fagocítica. Inmunohistoquímica doble para 4G8 (azul oscuro) y para Iba1 (marrón) en la formación hipocámpal de un caso Braak IV. La imagen panorámica muestra placas rodeadas de microglía (A1) con A β en el interior celular (imágenes ampliadas A2-A4, ver inserto en A2). La mayor parte de las placas seniles que presenta este individuo en el hipocampo se encuentran asociadas a microglía con depósitos 4G8-positivos en su interior, como señalan las imágenes B y C (flechas rojas indican A β intracelular). En los depósitos extracelulares de menor tamaño y densidad, puede observarse que numerosa microglía se encuentra en el interior de la placa y también acumula A β (D y E). La imagen F muestra en detalle que el marcaje intracelular de 4G8 se produce tanto en el cuerpo celular como en las prolongaciones microgliales. Barra de escala: A1: 100 μ m; A2-A3: 50 μ m; inserto en A2: 10 μ m; A4-B-F: 20 μ m.

Microglía/A β

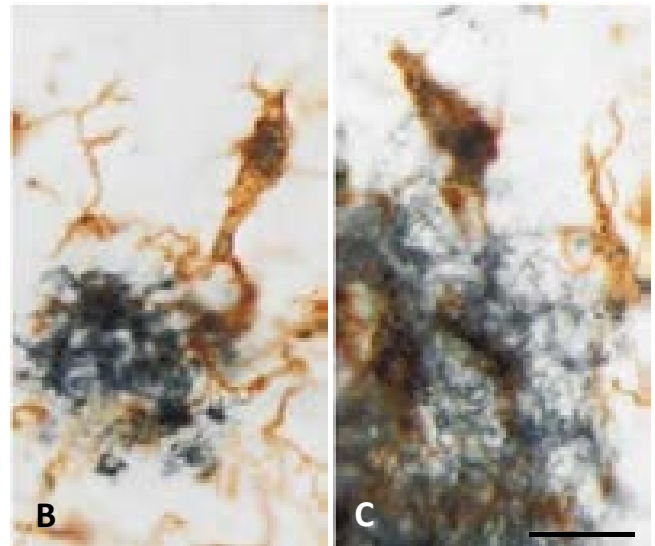
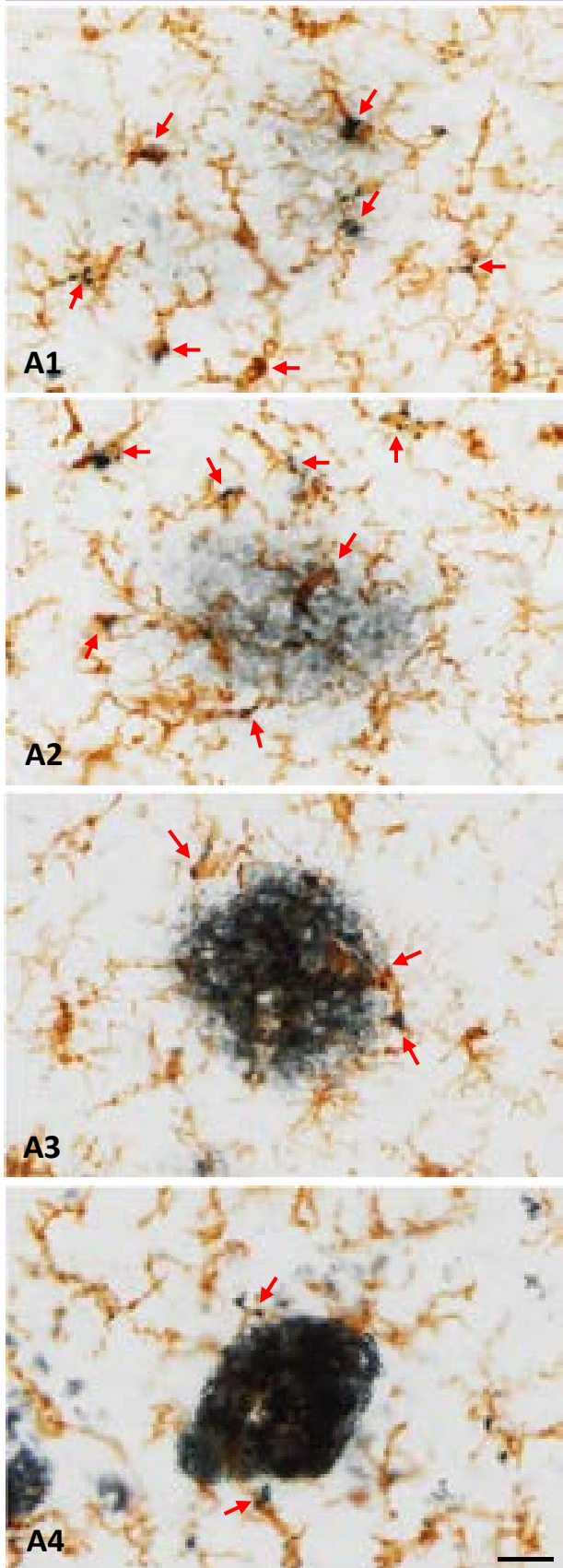


Figura 3.3.7. La interacción de la microglía reactiva con los depósitos de A β sugiere un posible papel de estas células en la formación/compactación de las placas amiloides. Inmunohistoquímica para 4G8 (azul oscuro) e Iba1 (marrón) en el giro parahipocampal de un individuo Braak IV. La secuencia de imágenes A1-A4 muestran diferentes grados de compactación de placas (de menor a mayor), sugerentes de la posible evolución en el proceso de formación de las placas y la participación activa de las células microgliales asociadas. Se indican con flechas rojas las células microgliales alrededor de las placas, siendo destacable el abundante A β intracelular que presentan. B y C muestran detalles de depósitos extracelulares laxos rodeados de células Iba1-positivas con una gran cantidad de péptido amiloide en su interior. El número de células microgliales con A β intracelular que rodea la placa es menor cuanto más compactos son los depósitos amiloides. Barra de escala: 20 μ m.

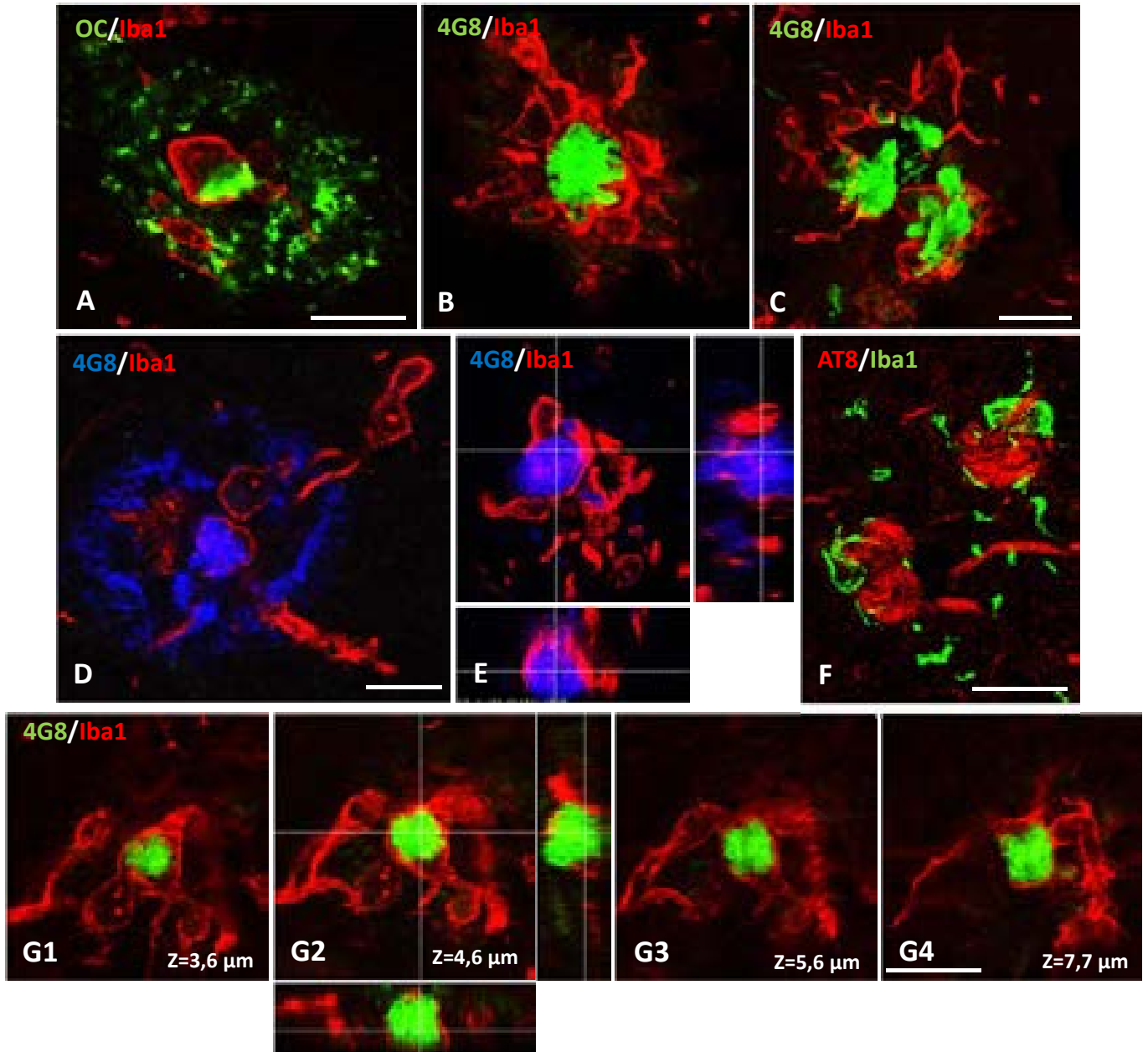


Figura 3.3.8. Relación de la microglía reactiva con las placas amiloides. Inmunofluorescencia doble a microscopía láser confocal para A β (OC o 4G8)/Iba1 (A-E y G) y para fosfo-tau (AT8)/Iba1 (F) en el hipocampo y giro parahipocampal de individuos en estadio avanzado Braak IV-VI. Las células microgliales localizadas en el interior de las placas se encuentran rodeando/compactando/fagocitando el núcleo de A β fibrilar (A-D). Esta interacción microglía/A β se aprecia en detalle en las reconstrucciones pseudo-3D (E y G2). La serie de imágenes G1-G4 muestran diferentes planos confocales de un depósito amiloide fibrilar en íntimo contacto con varias células microgliales, indicando una posible interacción compactación/fagocítica. Los ovillos neurofibrilares, positivos para AT8, se hallan también envueltos por microglía (F). Barra de escala: B-C: 20 μ m; A, D-G4: 10 μ m.

principalmente en la región CA1 y en el giro parahipocampal de pacientes dementes, y se correspondieron con depósitos clásicos y neuríticos. Mediante inmunotinción doble en campo claro con OC e Iba1 se observaron de nuevo células microgliales acumuladas en el interior de las placas amiloides y un área alrededor de los depósitos libre de microglía (Fig. 3.3.9 G). Cabe destacar que esta relación microglía/placa fue observada con independencia del estadio de Braak, siempre que el depósito de A β era de tipo neurítico y clásico (resultados no mostrados).

A diferencia de lo que ocurre en los pacientes de Alzheimer, con diferentes relaciones microglía/placa específicos de la región y del tipo de A β , en los ratones APP/PS1 las placas fibrilares (positivas para rojo Congo y Tioflavina-S, Fig. 3.3.9 H e I, respectivamente) y neuríticas (Fig. 3.3.9 J) se encontraron siempre totalmente rodeadas por células microgliales activadas, de manera similar a como ocurre en el giro dentado de las muestras humanas.

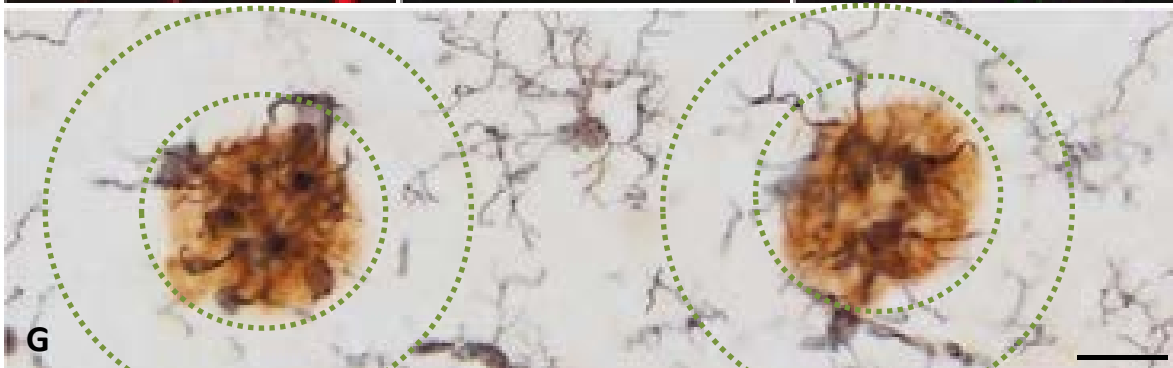
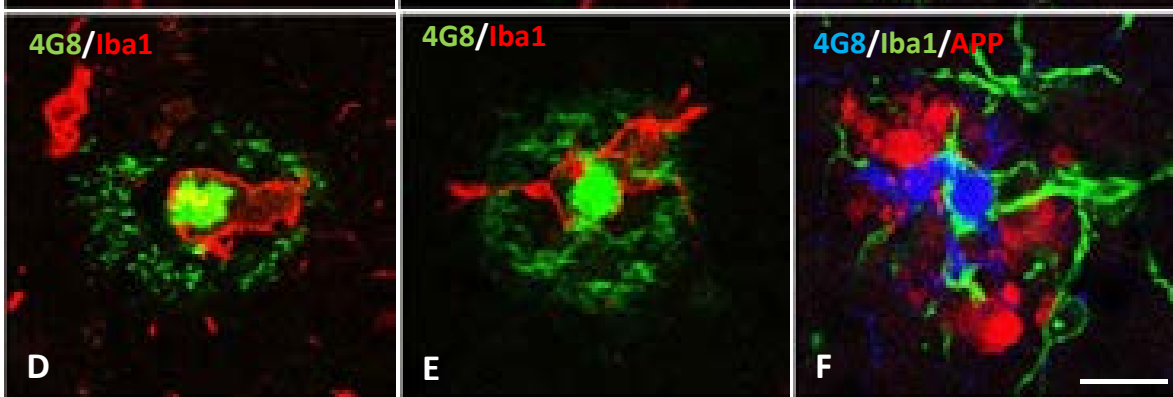
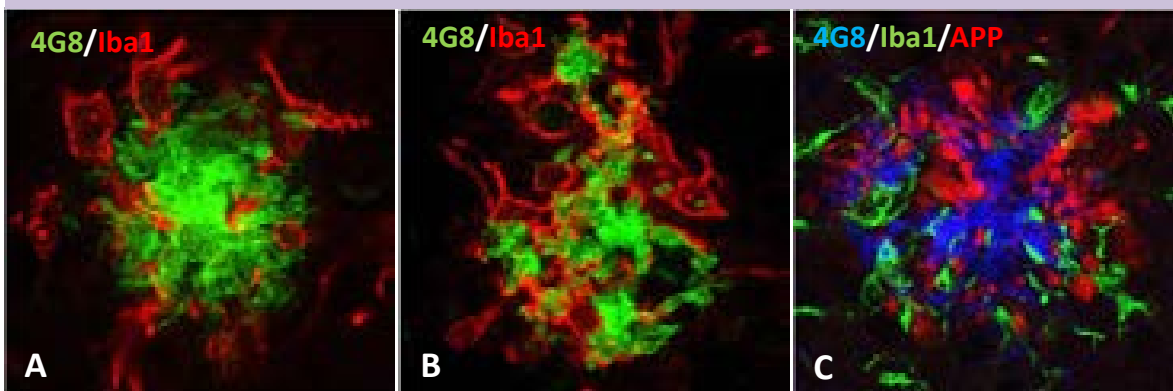
Sin embargo, no todas las placas seniles desencadenaron esta intensa respuesta microglial durante toda la progresión de la enfermedad. De hecho, los individuos en fases más avanzadas (Braak V-VI), presentaron placas con una menor cantidad de microglía asociada. En la figura 3.3.10 se muestran varios ejemplos de depósitos extracelulares fibrilares, de diferentes regiones de un mismo individuo en estadio avanzado Braak V-VI, con un escaso número de células microgliales asociadas que presentan marcaje intracelular 4G8.

3.3.3. Escasa infiltración de macrófagos y linfocitos en los pacientes de Alzheimer

Puesto que en los últimos años ha tomado gran valor la corriente científica que justifica la amplia respuesta microglial asociada a la patología amiloide en los modelos animales de Alzheimer, con una entrada de macrófagos periféricos, realizamos un estudio inmunohistoquímico simple con el marcador CD45 (macrófagos^{high}/microglía^{low}) en nuestro modelo de Alzheimer APP/PS1 (Fig. 3.3.11). El hipocampo de los animales transgénicos APP/PS1 de 12 meses de edad presentó una mayor inmunorreactividad para CD45 (Fig. 3.3.11 B), en comparación con los ratones de 4 meses (Fig. 3.3.11 A). Además, la inmunotinción para CD45 en los animales transgénicos fue muy intensa y se localizó principalmente en las células microgliales activas asociadas a las placas (ver detalles ampliados en la figura 3.3.11 A2 y B2), aunque también se observó en células compatibles con linfocitos, por su pequeño tamaño y aspecto redondeado, distribuidas por el parénquima nervioso (Fig. 3.3.11 B2) y en otras alrededor de los vasos, compatibles con macrófagos perivasculares (inserto en la Fig. 3.3.11 B2) desde los 4 meses (Fig. 3.3.11 A2). Estos datos son compatibles por tanto, con un origen periférico (macrófagos) de la microglía activada que rodea las placas.

Para esclarecer la naturaleza de las células CD45^{high} con aspecto de linfocitos, se realizó un doble marcaje fluorescente con CD3, y se determinó, como se observa en la imagen combinada C3

Braak IV-VI



APP/PS1

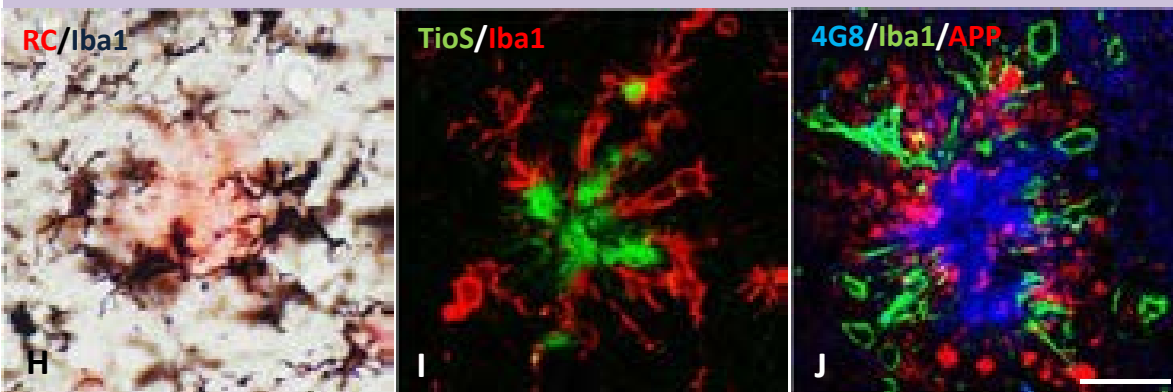


Figura 3.3.9. Asociación microglía/placa en muestras humanas en estadio Braak IV-VI (GD: A-C, CA1: D-F, GPH: G) y en el modelo APP/PS1 (H-J). Las placas fibrilares positivas para 4G8 (A y B) y neuríticas (C) del GD de pacientes Braak IV-VI se encuentran totalmente rodeadas por células microgliales activadas (positivas para Iba1), al igual que ocurre en los ratones APP/PS1 (amiloides fibrilares positivos para Rojo Congo y Tioflavina S: H e J, respectivamente; neuritas distróficas APP-positivas: J). Los depósitos de A β de tipo clásico y neurítico, como los de CA1 y el GPH de las muestras humanas, albergan células Iba1-positivas en el interior de éstos (D), las cuales rodean y/o fagocitan el núcleo de A β fibrilar (E, F). Mediante inmunotinción doble con OC (marrón)/Iba1 (azul oscuro) para campo claro se observan células microgliales acumuladas en el interior de las placas fibrilares y un área alrededor de los depósitos libre de microglía (G). Barra de escala: 20 μ m.

Braak V-VI

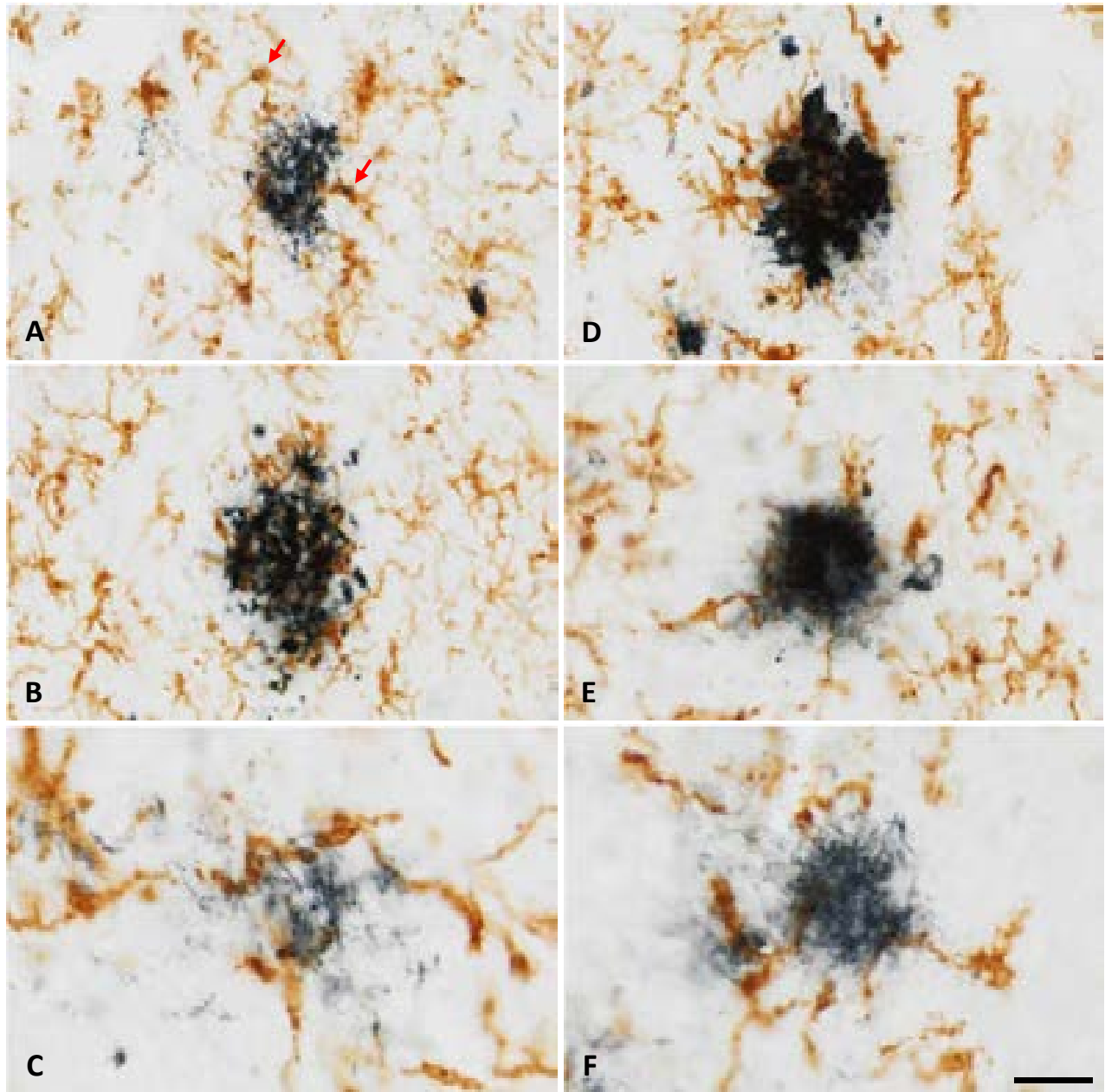


Figura 3.3.10. Relación microglía/placa en el hipocampo y giro parahipocampal de un paciente de Alzheimer Braak V-VI. Las imágenes con doble inmunotinción para OC (azul oscuro)/Iba1 (marrón) (A-F) muestran ejemplos de depósitos extracelulares, fibrilares y poco neuríticos (no mostrado) de diferentes regiones de un mismo caso de estadio avanzado, en los que se observan un escaso número de células microgliales con marcaje 4G8 intracelular rodeando las placas. Flechas indican Aβ intracelular. Barra de escala:20 μm.

de la figura 3.3.11, que en el hipocampo del modelo animal APP/PS1 había una gran cantidad de linfocitos T infiltrados.

Un estudio inmunohistoquímico similar en muestras humanas de individuos Braak V-VI, (Fig. 3.3.12) demostró un marcaje CD45^{medium} en la microglía reactiva que rodea las placas de A β (ver detalles A2 y B2 de la figura 3.3.12) y un marcaje CD45^{low} en las células de apariencia microglial localizadas en regiones interplaca (Fig. 3.3.12 A1 y B1). Además, el triple marcaje fluorescente a microscopía confocal (Fig. 3.3.12 C) corroboró que las células CD45 que rodeaban las placas eran células microgliales Iba1-positivas.

A diferencia de lo analizado previamente en el modelo murino, en los pacientes de Alzheimer se advirtieron muy pocas células CD45^{high} con apariencia de linfocitos en el parénquima nervioso (ver inserto de la figura 3.3.12 B2). Por el contrario, la mayor parte de las células CD45^{high} se localizaron a nivel perivascular, siendo negativas para Iba1 como cabía esperar (Fig. 3.3.13 A1-A3). Del mismo modo, el marcador de macrófagos MRC-1 se expresó casi exclusivamente asociado a los vasos sanguíneos (Fig. 3.3.13 B1, detalle ampliado en B2). Por último, la inmunotinción para CD3 (Fig. 3.3.13 C1 y C2) demostró la limitada infiltración de linfocitos T que se produjo en los casos más avanzados de la patología (Braak V-VI), a diferencia de los modelos.

Los datos obtenidos en muestras humanas indicarían un posible origen periférico de las células microgliales activadas que se asocian a las placas, al igual que en modelos transgénicos. Sin embargo, para poder afirmar esta hipótesis es necesario descartar que la microglía activada sea capaz de expresar un perfil molecular similar a los macrófagos. Para ello, realizamos varias aproximaciones. Se realizó, en primer lugar, un amplio estudio cuantitativo de la expresión de ARNm de los marcadores de activación microgliales presentes en el hipocampo de los ratones APP/PS1 de 18 meses de edad (Fig. suplementaria 3.5 A), edad en la que los animales presentan una elevada activación microglial. El perfil obtenido fue CD45+/CCR2+/CX3CR1-/P2ry12-, compatible con la infiltración de macrófagos. Sin embargo, pudimos comprobar *in vitro* que la microglía primaria estimulada con LPS (Fig. suplementaria 3.5B) también era capaz de emular este perfil de expresión de los macrófagos periféricos. Además, fue destacable en ambos casos el bajo nivel de expresión de CX3CR1 en paralelo al aumento de CCR2, marcadores de microglía y macrófagos, respectivamente. Más aún, se analizó el efecto de la estimulación por LPS en células microgliales adultas sobre la expresión de P2ry12 (sólo se expresa en microglía adulta), observándose una bajada en la expresión de este marcador en comparación con las células estimuladas con PBS (Fig. suplementaria 3.5 C).

Todos estos datos, obtenidos en colaboración con el laboratorio del Dr. Vitorica de la Universidad de Sevilla, indican que los perfiles de activación observados tanto en modelos como en pacientes de Alzheimer podrían ser explicados por la activación microglial en ausencia de infiltración de macrófagos.

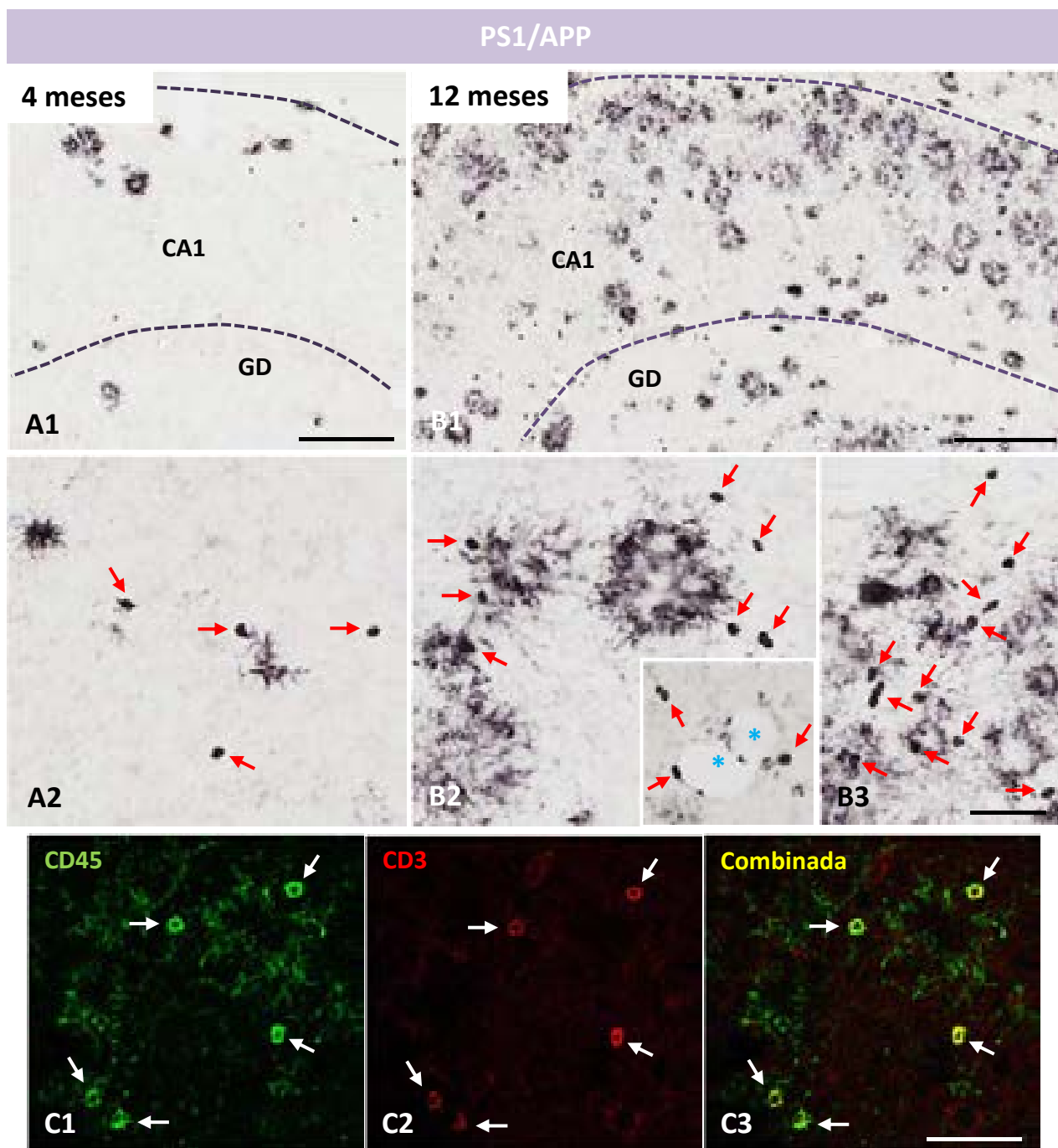


Figura 3.3.11. En el modelo transgénico APP/PS1 el marcador CD45 se expresa en la microglía activada que rodea las placas de A β y en linfocitos T (CD3-positivos) infiltrados. Inmunotinción simple para CD45 (microglía/macrófagos) y doble fluorescente para CD45/CD3 (linfocitos T) en el hipocampo de ratones APP/PS1 de 4 (A) y 12 meses de edad (B y C). El hipocampo de los animales transgénicos de 12 meses presenta una gran inmunorreactividad para CD45 (B1), en comparación con los ratones de 4 meses de edad (A1). El marcaje CD45 positivo se concentra especialmente alrededor de las placas asociado a microglía (A2, B2), aunque también se observan células redondas, de menor tamaño (sin apariencia microglial), distribuidas por el parénquima nervioso (B3) y alrededor de vasos (inserto en B2), que incrementan en número a lo largo de la patología (flechas rojas en A2, B2 y B3). La imagen combinada de microscopía láser confocal (C3) indica que las células CD45^{high} y sin apariencia microglial (C1) son también positivas para CD3 (marcador de linfocitos T) (C2). Estos datos son compatibles con un origen periférico (macrófagos) de la microglía que rodea las placas. Barra de escala: A1-B1: 200 μ m; A2-B2-inserto en B2; B3: 50 μ m, C1-C3: 50 μ m.

Braak V-VI

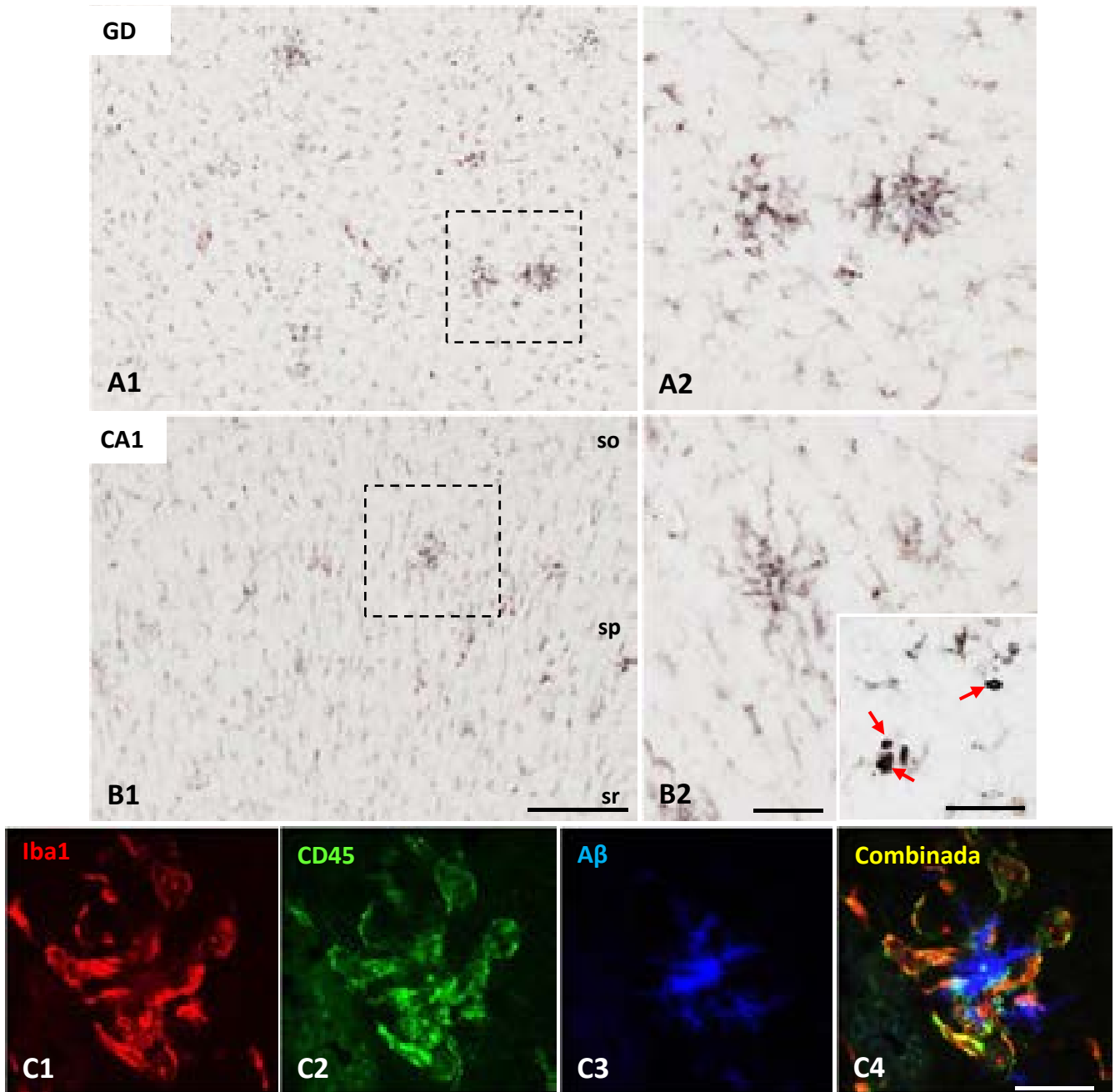


Figura 3.3.12. Moderada inmureactividad para CD45 en el GD (A) y CA1 (B) del hipocampo de pacientes dementes Braak V-VI. Se observa un marcaje CD45^{medium} asociado a las células microgliales reactivas que rodean las placas de Aβ (detalles en A2 y B2) y CD45^{low} en la microglia localizada en regiones interplaca (A1 y B1). A diferencia de lo que ocurre en el modelo APP/PS1, en los pacientes de Alzheimer se observan muy pocas células CD45^{high} con apariencia de linfocitos en el parénquima nervioso (flechas rojas en inserto en B2). El triple marcaje fluorescente a microscopía confocal (C1-C4) indica que las células CD45-positivas (C2) asociadas con los depósitos de Aβ (C3) se corresponden con células microgliales Iba1-positivas (C1 y C4). *so*: stratum oriens; *sp*: stratum pyramidale; *sr*: stratum radiatum. Barra de escala: A1-B1: 250 μm; B2 e inserto en B2: 50 μm; C1-C4: 10 μm.

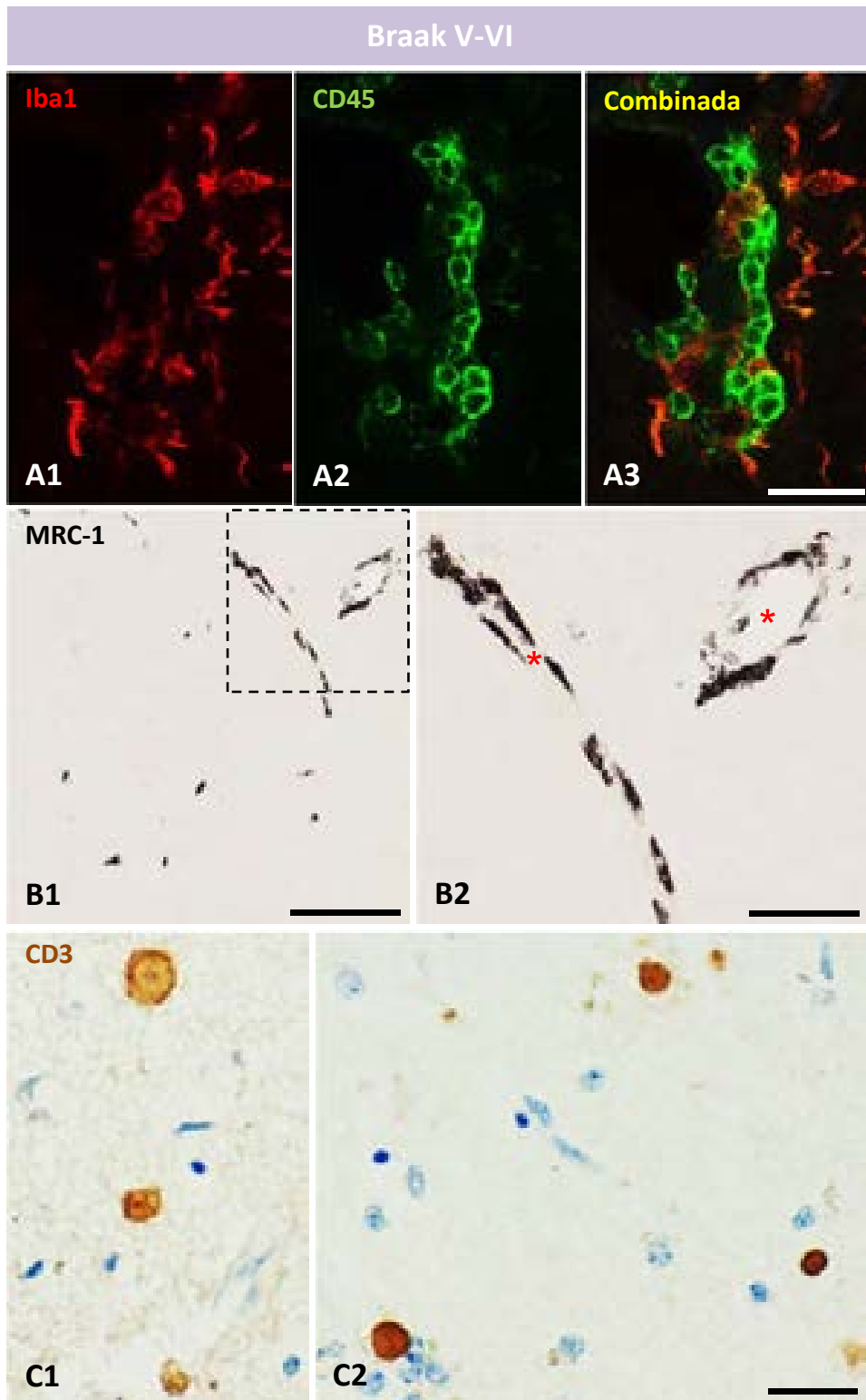


Figura 3.3.13. En el hipocampo y giro parahipocampal de los pacientes de Alzheimer se produce una escasa infiltración de macrófagos y linfocitos. Como muestran las imágenes para microscopía láser confocal, la mayor parte de las células CD45^{high} se localizan a nivel perivascular (A2), y además, son negativas para el marcador microglial Iba1 (A1 y A3). Del mismo modo, el marcador de macrófagos MRC-1 se expresa casi exclusivamente asociado a los vasos sanguíneos (B, detalle ampliado en B2, asteriscos indican vasos). Además, la inmunotinción para CD3 demuestra que se produce una limitada infiltración de linfocitos T en los casos más avanzados de la enfermedad, como puede observarse en las imágenes C1 y C2 (CD3 en marrón, contratinción con violeta de cresilo). Barra de escala; A1-A3: 25 µm; B1: 200 µm; B2: 100 µm; C1-C2: 20 µm.

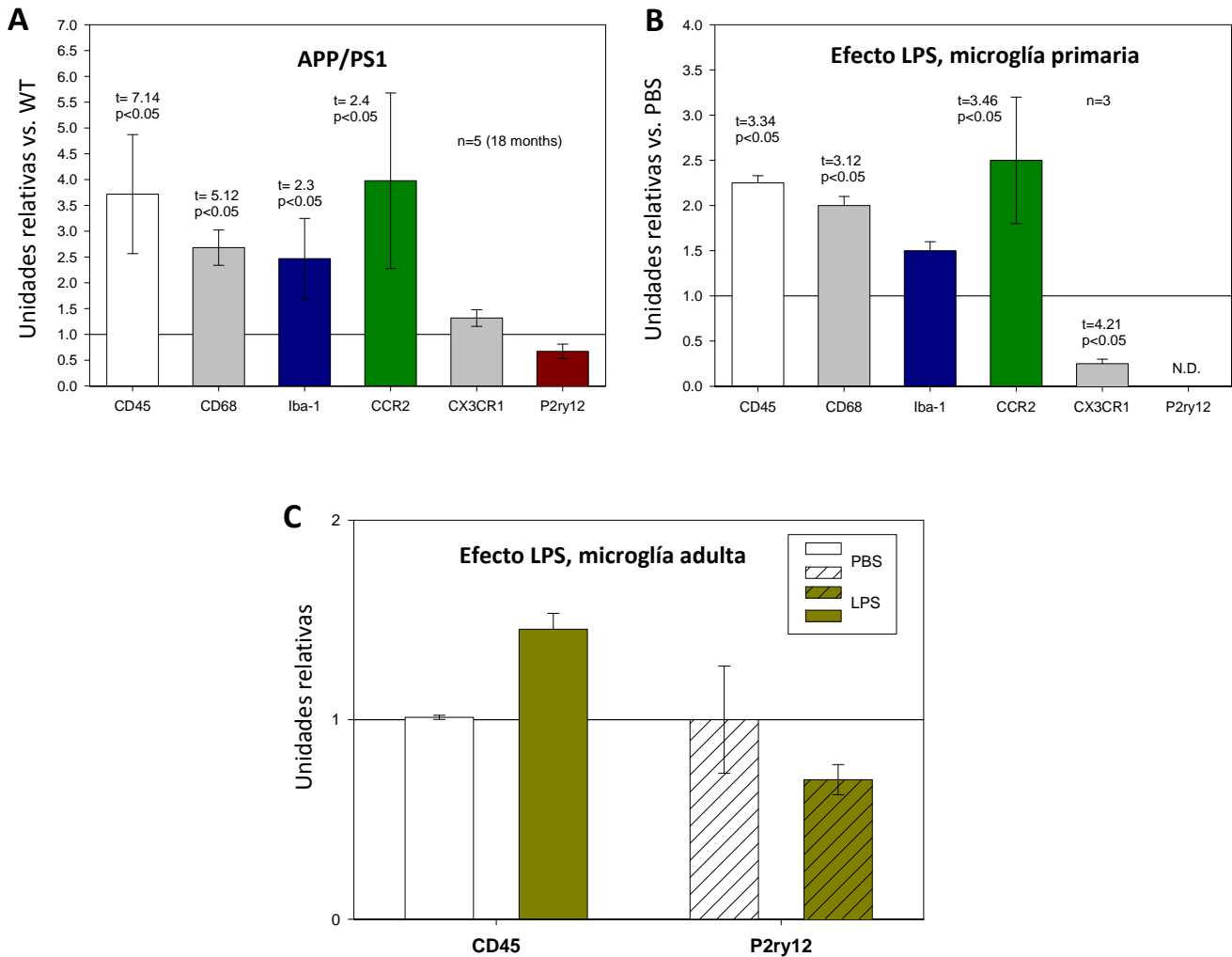


Figura Suplementaria 3.5. La microglía activada expresa un perfil de marcadores similar al de macrófagos periféricos.

A) Perfil de activación de la microglía presente en el hipocampo de modelos APP/PS1 de 18 meses de edad. Presenta un claro perfil compatible con la infiltración de macrófagos CD45+/CCR2+/CX3CR1-/P2ry12-. **B)** Perfil de activación de la microglía primaria estimulada con LPS. El perfil es idéntico al observado en modelos APP/PS1, sin embargo en este caso todas las células son microgliales. En consecuencia, la activación microglial determina un perfil de expresión de marcadores similares a los macrófagos periféricos. En concreto es destacable la pérdida de expresión de CX3CR1, y el aumento de CCR2, marcadores ambos de microglía y macrófagos respectivamente. **C)** Para determinar el efecto de la activación sobre la expresión de P2ry12 se utilizaron células microgliales adultas en experimentos *ex vivo*. Como se observa en la gráfica la estimulación por LPS disminuye la expresión de P2ry12. Resultados obtenidos en colaboración con el Dr. Javier Vitorica de la Universidad de Sevilla.

3.3. 4. Degeneración microglial en el hipocampo y giro dentado de los pacientes de Alzheimer (Braak V-VI)

Tras comprobar que en el hipocampo y giro parahipocampal de los pacientes de Alzheimer se produce una leve activación microglial, limitada a las placas de A β , y que determinadas regiones presentan una disminución en la densidad de células microgliales, en especial en el giro dentado, se realizó un estudio cualitativo comparativo en esta región, tanto de ratones APP/PS1 como de las muestras humanas, mediante inmunohistoquímica con Iba1 (Fig. 3.3.14). El giro dentado de los animales transgénicos mostró una elevada respuesta microglial a los 12 meses (Fig. 3.3.14 B1), en comparación con los 4 meses de edad (Fig. 3.3.14 A1), edad a la que ya se detectaron células microgliales reactivas (ver inserto de la Fig. 3.3.14 A2), similares morfológicamente a las observadas a los 12 meses (ver inserto de la Fig. 3.3.14 B2). Sin embargo, en el giro dentado de los pacientes Braak V-VI disminuyó notablemente la densidad de las células Iba1-positivas (Fig. 3.3.14 D1), en comparación con las secciones de las muestras Braak II (Fig. 3.3.14 C1). Además, como se observa en el inserto de la figura 3.3.14 (D2), las células microgliales presentaron una apariencia patológica.

Por tanto, en el giro dentado de los pacientes Braak V-VI se observó una disminución de la población de células Iba1-positivas, al contrario de lo que se esperaba encontrar teniendo en cuenta el aumento de la activación microglial de los modelos animales. Como muestran las imágenes de la figura 3.3.15, el giro dentado de individuos en estadios leves presentó una gran densidad de células microgliales, distribuidas homogéneamente (Fig. 3.3.15 A1, detalle ampliado en A2), y mostrando un fenotipo no reactivo (Fig. 3.3.15 A3). Sin embargo, el giro dentado de los casos dementes reveló una menor cantidad de células inmunoteñidas para Iba1 (Fig. 3.3.15 B1), acompañada de una redistribución de las células, apareciendo zonas despobladas y zonas con agrupaciones de células asociadas a las placas (Fig. 3.3.15 B2 y B3). Además, se observaron características senescentes en las células microgliales del giro dentado de los individuos Braak V-VI (atrofia celular, pérdida de ramificaciones y fragmentaciones) (ver inserto en la Fig. 3.3.15 B2).

Estos resultados sugerentes de degeneración microglial en el giro dentado de los pacientes Braak V-VI, obtenidos hasta el momento a nivel cualitativo, fueron corroborados mediante análisis cuantitativos. El recuento estereológico de la población de células Iba1 positivas (Fig. 3.3.16 A) no mostró cambios significativos a lo largo de los estadios de Braak debido a la gran variabilidad interindividual existente (n° células/mm³, Braak II: 12081 \pm 1761; Braak III-IV: 12273 \pm 2347; Braak V-VI: 8495 \pm 4437) aunque mostró dos grupos de individuos Braak V-VI completamente polarizados, uno con una densidad celular similar al presentado por el estadio Braak II y otro con una gran pérdida de células microgliales (Fig. 3.3.16 A). Sin embargo, el estudio del porcentaje del área ocupada por las células microgliales (carga microglial) sí que presentó diferencias significativas (Fig. 3.3.16 B) (Braak II: 30,84 \pm 3,53; Braak III-IV: 21,58 \pm 15,05; Braak V-VI: 11,87 \pm 5,57). En concreto, el área inmunorreactiva de las células Iba1-positivas en el giro dentado de los enfermos de Alzheimer disminuyó un 54% en comparación con los individuos en estadio leve Braak II de la misma edad. Las

muestras analizadas de individuos Braak III-IV no presentaron cambios significativos debido a la gran variabilidad en el valor de los datos (Fig. 3.3.16 C). Se analizó también la redistribución espacial de la población microglial observada en los casos Braak V-VI mediante un histograma de frecuencias (Fig. 3.3.16 D) en el que se representaron los datos del área de “dominio microglial” obtenidos tras un análisis en cuadrícula de la carga microglial. Así pues, y como se muestra en los ejemplos de la figura 3.3.16 (E), las células microgliales del giro dentado de los individuos Braak II y Braak V-VI mostraron dos distribuciones espaciales claramente diferenciadas: una distribución homogénea, con alta densidad celular en los casos leves, y una distribución heterogénea con menor densidad celular (con zonas aglomeradas y zonas vacías) en los individuos dementes. Dependiendo del caso analizado, las muestras de estadio moderado Braak III-IV exhibieron una u otra distribución.

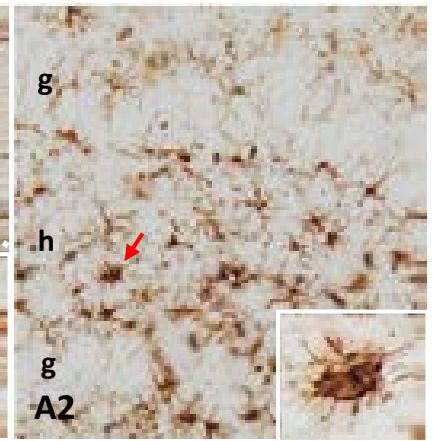
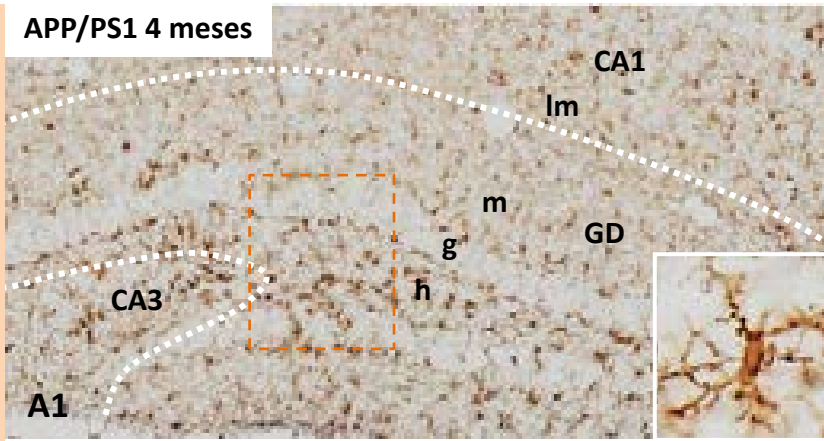
El estudio del área ocupada por la población de células microgliales se extendió también a otras regiones como CA3, CA1 y la corteza perirrinal del giro parahipocampal (Fig. 3.3.17). Al igual que en el giro dentado, las células microgliales de estas regiones se distribuyeron homogéneamente y presentaron un fenotipo no reactivo en los casos Braak II (Fig. 3.3.17 A1-C1, detalles ampliados en A2-C2). Además, en los individuos con Alzheimer se observaron cambios morfológicos y una redistribución espacial, con agrupaciones de microglía asociadas a las placas (ver detalles ampliados D2-F2 en la figura 3.3.17). Sin embargo, tan solo el análisis cuantitativo de la carga de células Iba1-positivas en la región CA3 demostró una disminución significativa del 40 % en las muestras Braak VI, en comparación con los casos leves de la misma edad (% área Iba1 positiva, Braak II: $28,55 \pm 3,72$; Braak III-IV: $21,50 \pm 10,11$; Braak V-VI: $14,71 \pm 4,05$) (Fig. 3.3.17 G).

Los gráficos mostrados en la figura 3.3.18 pretenden resumir y comparar los resultados del análisis del área Iba1-positiva obtenidos en todos los individuos Braak II, Braak III-IV y Braak V-VI, en las diferentes regiones analizadas del hipocampo y giro parahipocampal. El marcado gradiente observado en el área ocupada por las células microgliales de los individuos en estadio leve (de mayor a menor: GD, CA3, CA1 y GPH) (Fig. 3.3.18 A) desapareció en las muestras de los pacientes de Alzheimer con la disminución significativa en el giro dentado y CA3 (Fig. 3.3.18 C). Los casos de estadio moderado Braak III-IV mostraron tendencias polarizadas hacia Braak II o Braak V-VI (Fig. 3.3.18 B).

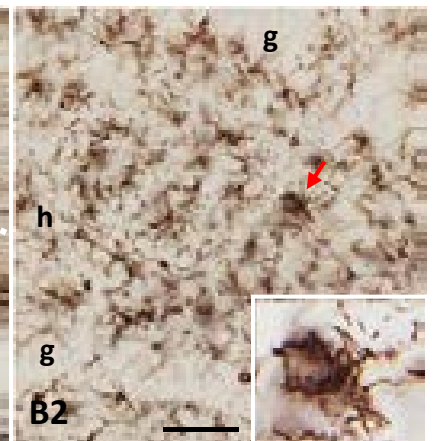
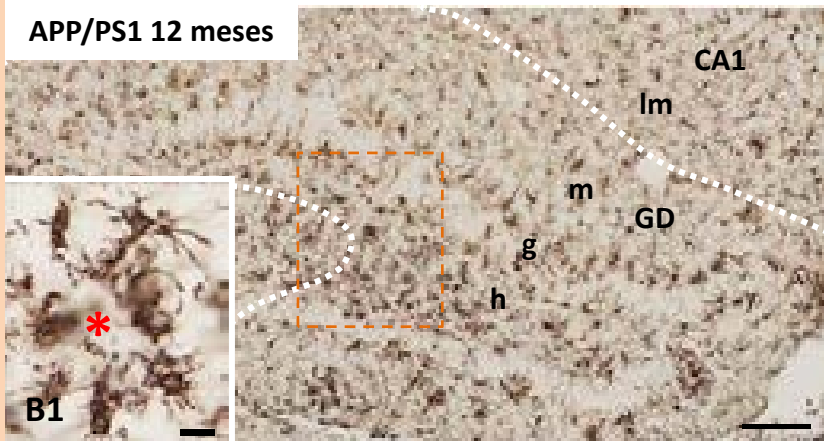
Por tanto, podríamos concluir según los resultados obtenidos hasta el momento, que los enfermos de Alzheimer presentan una ligera respuesta microglial, cuya activación está restringida a las placas de A β , y que en regiones como el giro dentado y CA3 tiene lugar además un proceso de degeneración microglial.

Más aún, en determinados casos Braak V-VI se advirtieron áreas despobladas de microglía, incluso en regiones próximas a las placas de A β , no solo en el giro dentado (Fig. 3.3.19), sino también en otras regiones del hipocampo y del giro parahipocampal (Fig. 3.3.20). Las imágenes panorámicas

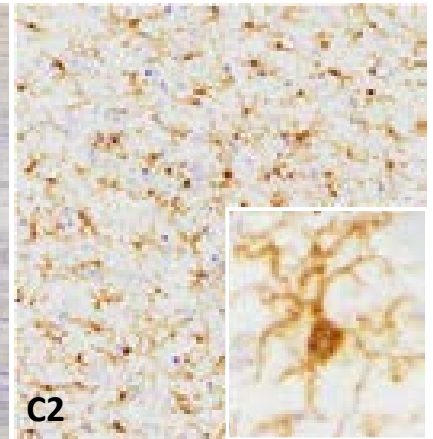
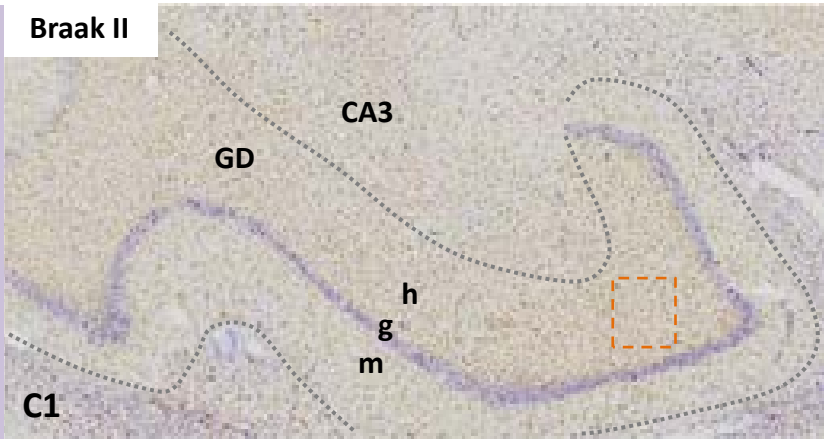
APP/PS1 4 meses



APP/PS1 12 meses



Braak II



Braak VI

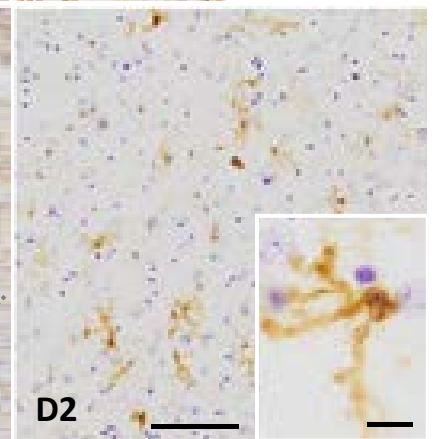
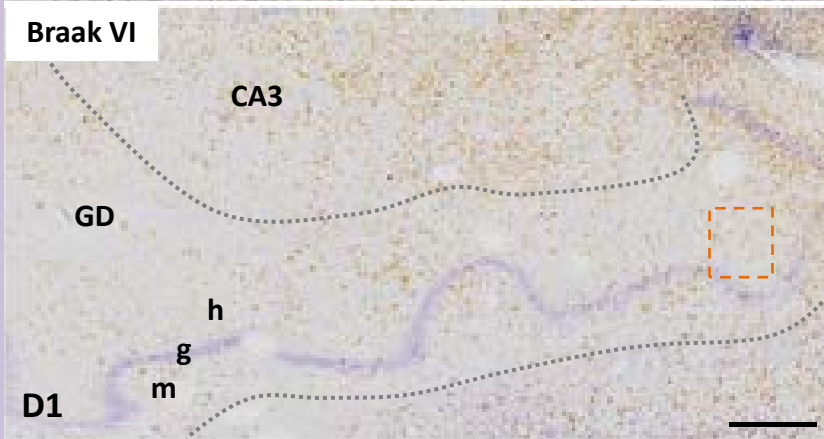


Figura 3.3.14. El giro dentado del modelo transgénico APP/PS1 presenta un aumento de la reactividad microglial con la edad, en contraposición a lo observado en pacientes de Alzheimer. En los animales APP/PS1 el giro dentado muestra una elevada respuesta microglial asociada al A β que aumenta con la edad (A1 y B1, 4 y 12 meses de edad respectivamente, asterisco indica placa). Desde los 4 meses se detectan células microgliales reactivas (ver inserto en A2, flechas rojas indican células microgliales activadas), similares morfológicamente a las observadas a 12 meses (ver inserto en B2). Sin embargo, esto no se aprecia en el GD de los individuos Braak V-VI (D), en el que disminuye notablemente la densidad de células Iba1-positivas (detalle ampliado en D2), en comparación con las secciones Braak II (C). Los insertos en C2 y D2 muestran detalles de células microgliales del GD de individuos Braak II y Braak V-VI, respectivamente. *m: capa molecular; g: capa granular; h: capa polimórfica o hilio; GD: giro dentado; CA: asta de Amón.* Barras de escala: A1- B1: 100 μ m; inserto en A1, A2, B2, C2 y D2: 10 μ m; inserto en B1: 10 μ m; A2-B2: 50 μ m; C1-D1: 500 μ m; C2-D2: 100 μ m.

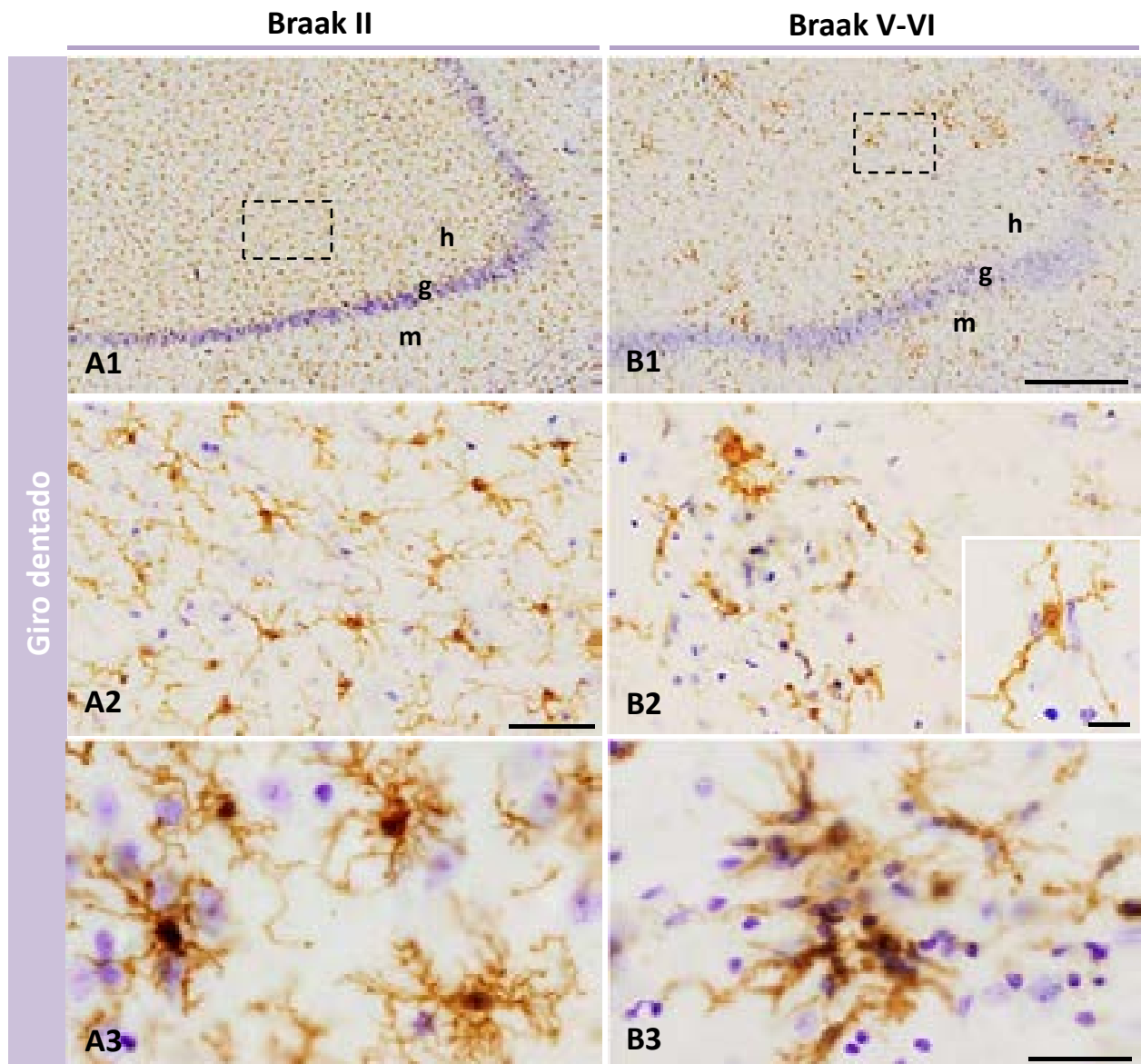


Figura 3.3.15. Disminución de la población de células microgliales Iba1-positivas en el giro dentado de los pacientes de Alzheimer Braak V-VI (B) en comparación con los individuos en estadio Braak II (A). En estadios leves, el giro dentado presenta una gran densidad de células microgliales, que se distribuyen de manera homogénea y equidistante (A2). Además, estas células muestran fenotipo no reactivo (A3). Sin embargo, el GD de los individuos dementes presenta una menor inmunotinción para Iba1 (B1) y una redistribución de las células microgliales, apareciendo zonas negativas o vacías y zonas con agrupaciones (B2 y B3), asociadas a las placas. Además, las células microgliales del GD de individuos Braak V-VI muestran una morfología senescente, con fragmentaciones y pérdida de ramificaciones (B3). *m: capa molecular; g: capa granular; h: capa polimórfica o hilio.* Barra de escala: A1-B1: 500 μm , A2-B2: 50 μm ; A3-B3: 20 μm ; inserto en B2: 10 μm .

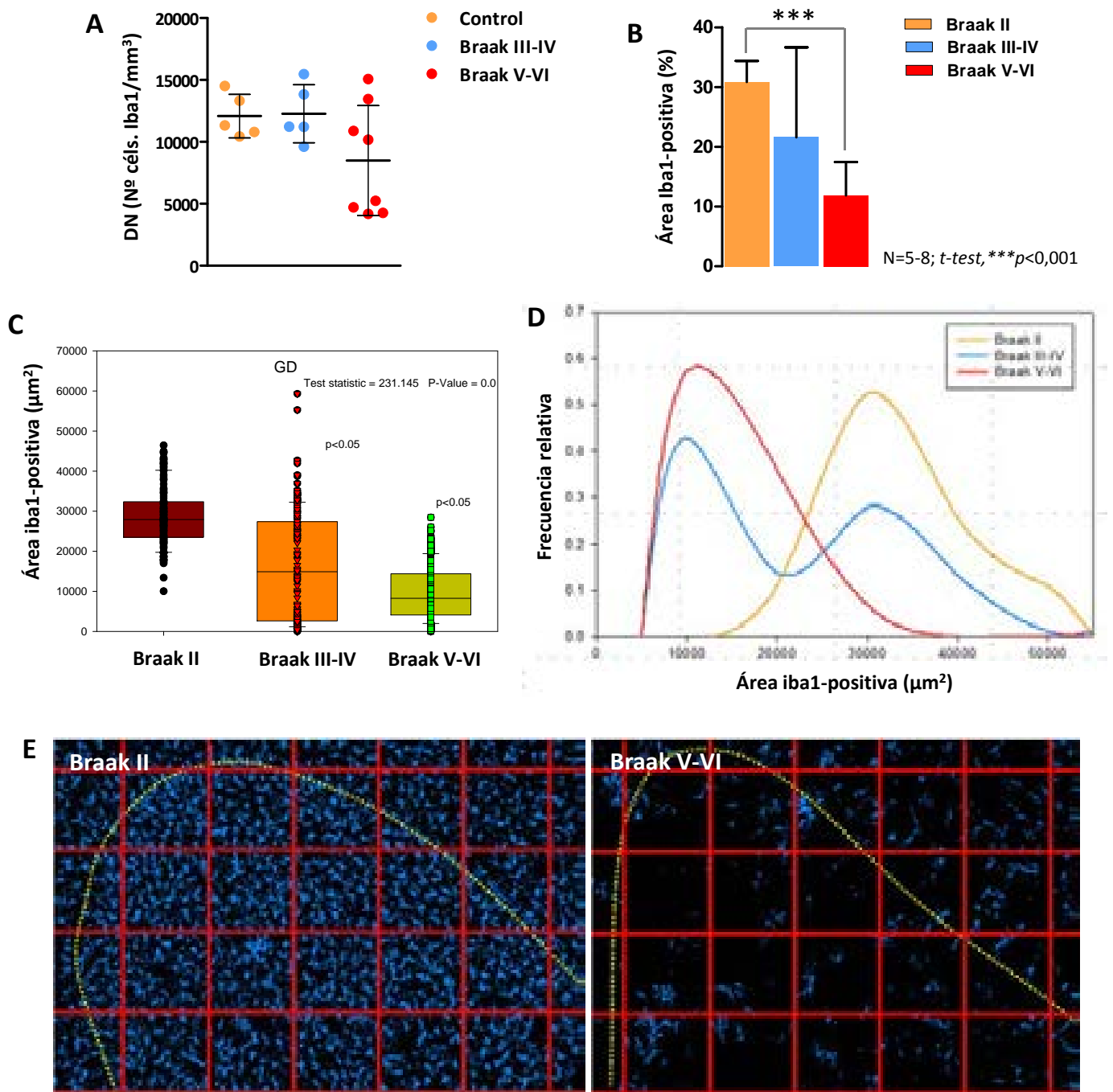


Figura 3.3.16. Degeneración microglial en el giro dentado de pacientes Braak V-VI. Estudios cuantitativos de la población microglial en el giro dentado de individuos Braak II, Braak III-IV y Braak V-VI. A) El recuento estereológico de la población de células Iba1-positivas indica que no se produce pérdida significativa de células microgliales con la progresión de la enfermedad, debido a la gran variabilidad interindividual. B) Sin embargo, se produce una disminución significativa del área ocupada por las células microgliales en el GD de Braak V-VI. C) La representación de los datos obtenidos en el análisis de la carga microglial muestra la gran variabilidad de las muestras, especialmente en los individuos de estadio moderado Braak III-IV. D) El histograma de frecuencias, que representa los datos obtenidos en el análisis en cuadrícula de la carga microglial (ver ejemplos en E), muestra cambios en el área de "dominio microglial" con dos distribuciones claramente diferenciadas en el GD: distribución homogénea con alta densidad celular en Braak II, y heterogénea con menor densidad celular (con zonas aglomeradas y zonas vacías) en Braak V-VI. Los individuos Braak III-IV exhiben una u otra, dependiendo del caso analizado.

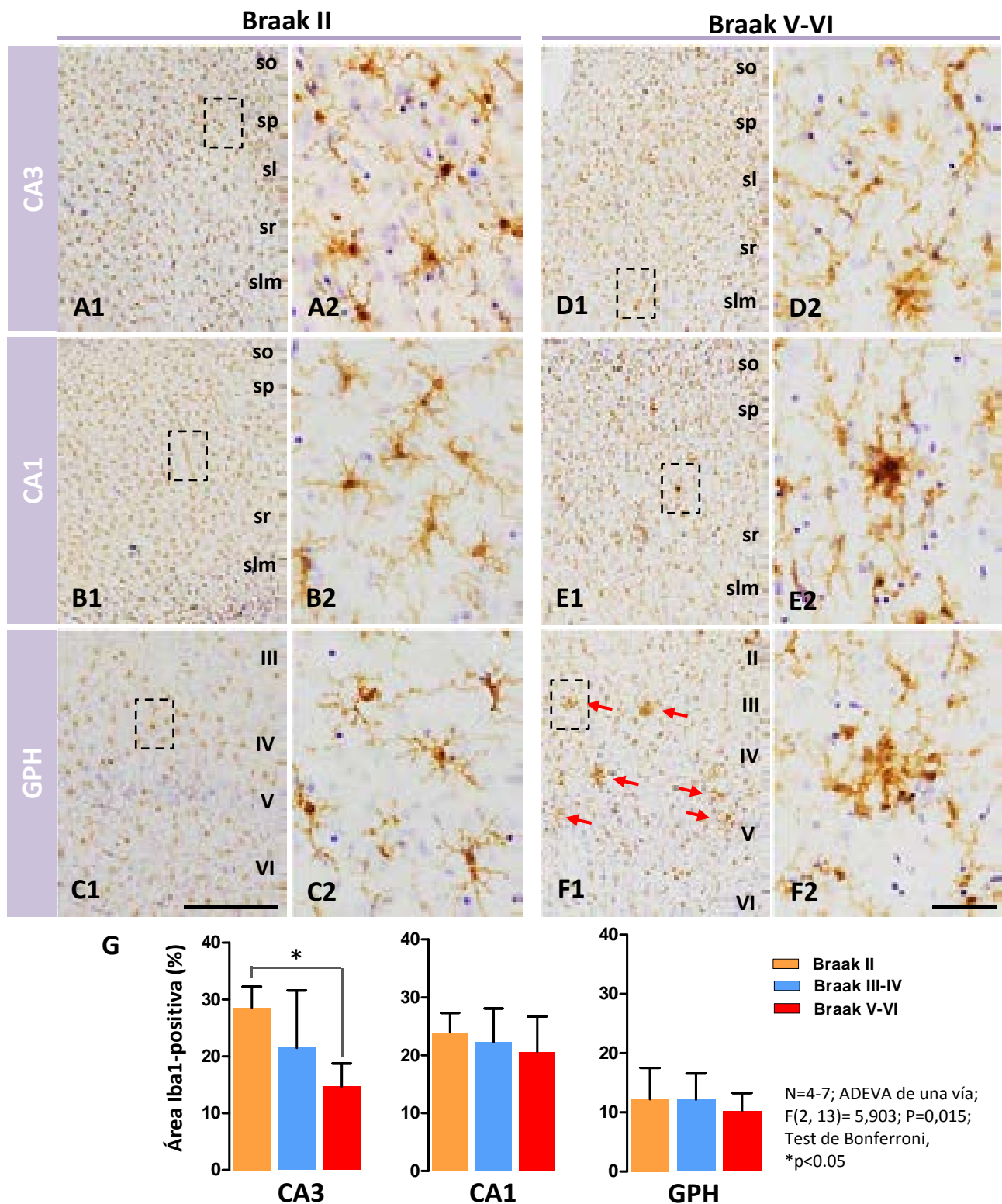


Figura 3.3.17. Estudio comparativo de la población de células microgliales en las regiones CA3, CA1 y GPH de individuos Braak II (A-C) y pacientes dementes Braak V-VI (D-F). Inmunohistoquímica para Iba1 y contratinción con violeta de cresilo. Al igual que ocurre en el GD, las células microgliales en estas regiones analizadas muestran un fenotipo no reactivo y se distribuyen homogéneamente (A2-C2) en las muestras Braak II. Sin embargo, en los individuos con Alzheimer se observan cambios morfológicos y redistribución espacial con agrupaciones de microglía (ver detalles ampliados en D2-F2, flechas rojas indican cúmulos microgliales asociados a las placas). G) Estudio cuantitativo de la carga microglial (Iba1-positiva). Se produce disminución significativa del área ocupada por células Iba1-positivas únicamente en la región CA3 de las muestras Braak V-VI, en comparación con los casos Braak II de la misma edad. *so*: *stratum oriens*; *sp*: *stratum pyramidale*; *sr*: *stratum radiatum*; *slm*: *stratum lacunosum-moleculare*. Barra de escala: A1-F1: 500 μ m; A2-F2: 25 μ m.

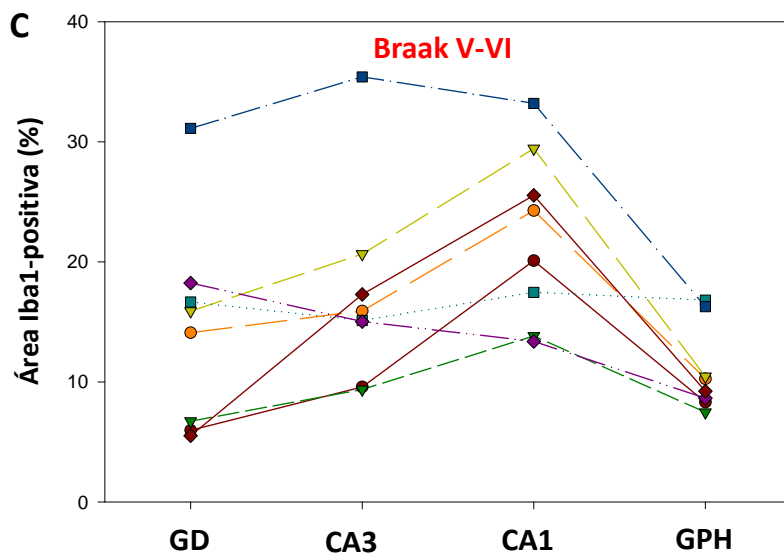
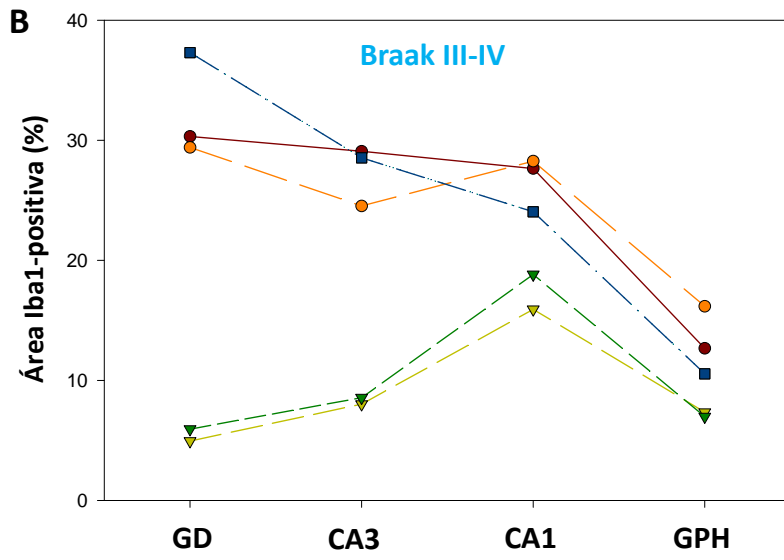
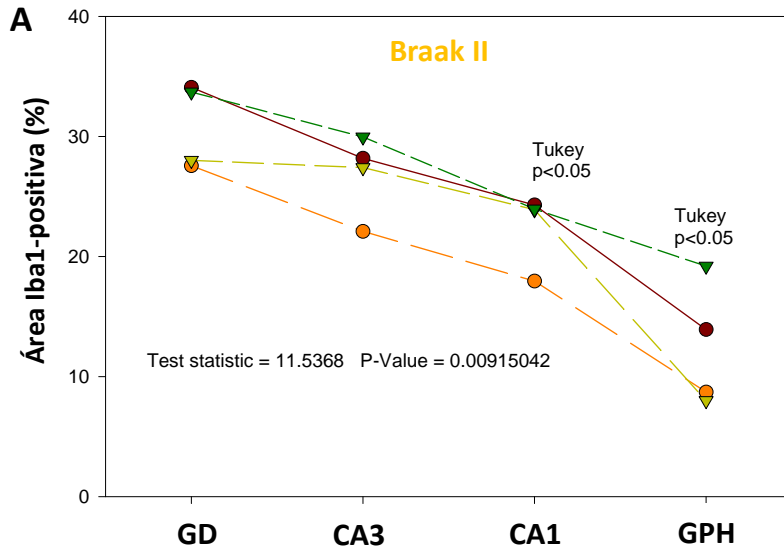


Figura 3.3.18. El giro dentado y CA3 son las regiones más afectadas por la degeneración microglial en los individuos Braak V-VI. Representación comparativa de los valores del área Iba1-positiva obtenidos en todos los individuos Braak II (A), Braak III-IV (B) y Braak V-VI (C) en las diferentes regiones analizadas del hipocampo (GD, CA3 y CA1) y giro parahipocampal (corteza perirrinal). El gradiente observado en la carga microglial de los casos Braak II (GD>CA3>CA1>GPH) (A), desaparece en las muestras Braak V-VI con la bajada significativa en el GD y CA3 (C). Los casos de estadio intermedio Braak III-IV presentan tendencias polarizadas hacia Braak II o Braak V-VI (B).

densidad de células microgliales. En los detalles ampliados de las mismas regiones A2 y B2, se muestran placas amiloides con escasas células de microglía alrededor, las cuales además presentaban características morfológicas patológicas (Fig. 3.3.19 C1 y C2). Del mismo modo, en el giro parahipocampal de algunos enfermos de Alzheimer se observaron también placas desprovistas de células microgliales (Fig. 3.3. 20 A1, detalle ampliado en A2). Sin embargo, no todos los depósitos de A β presentaron el mismo efecto en la microglía. Como puede observarse en las imágenes B1 y B2 de la figura 3.3.20, correspondientes a la región CA3, se encontraron placas con una gran cantidad de células Iba1-positivas alrededor.

Hemos descrito anteriormente el patrón característico de acumulación de A β que presenta la capa parvopiramidal del presubículo en los enfermos de Alzheimer. Esta distribución del β -amiloide nos ayudó a comparar el estado morfológico que presentaba la población microglial en esta región cortical (Fig. 3.3.21 A1): aparentemente normal en la región sin A β (Fig. 3.3.21 A2, detalle ampliado en A3), y con apariencia patológica (atrófica y fragmentada) en la región con depósito amiloide (Fig. 3.3.21 A2, detalle ampliado en A3). Sin embargo, no podemos descartar otras causas de la degeneración microglial en esta región en concreto, no relacionadas con la acumulación de β -amiloide.

Para profundizar en el estudio de la degeneración microglial y comprobar que la pérdida de células Iba1-positivas se trataba de degeneración y no de pérdida de fenotipo, se analizó otro marcador de microglía, el receptor purinérgico P2ry12 (marcador de microglía endógena o residente).

En primer lugar, se realizó un estudio inmunohistoquímico comparativo entre el marcador general de microglía, Iba1, y el marcador de microglía residente, P2ry12, en diferentes regiones del hipocampo y giro parahipocampal de individuos Braak II y Braak V-VI (Fig. 3.3. 22). Los individuos Braak II mostraron células con apariencia microglial P2ry12 positivas con un fenotipo no reactivo característico (Fig. 3.3.22 A2, ver inserto) y se distribuyeron homogéneamente por todas las capas de CA1 (Fig. 3.3.22 A1), al igual que ocurrió con el marcador Iba1 (no mostrado, analizado previamente). Sin embargo, en los pacientes de Alzheimer, las células P2ry12 se comportaron de manera diferente a las células Iba1-positivas. Como se aprecia en la imagen B1 de la figura 3.3.22, la microglía P2ry12 no se agrupó alrededor de las placas de A β (ver detalle ampliado de la misma figura) como ocurrió con las células Iba1-positivas (Fig. 3.3.22 C1 y detalle ampliado en C2).

Para comprobar que el marcador P2ry12 no se expresa en la microglía reactiva, se analizó mediante microscopía confocal la expresión de P2ry12 en población microglial que se encuentra asociada a las placas en las muestras humanas. Efectivamente y como cabía esperar, las células microgliales que se encontraban en íntimo contacto con los depósitos amiloides fibrilares fueron positivas únicamente para Iba1 (Fig. 3.3.23 A y B). La expresión de ambos marcadores fue patente en las células microgliales situadas en regiones interplaca y que presentaban un claro fenotipo

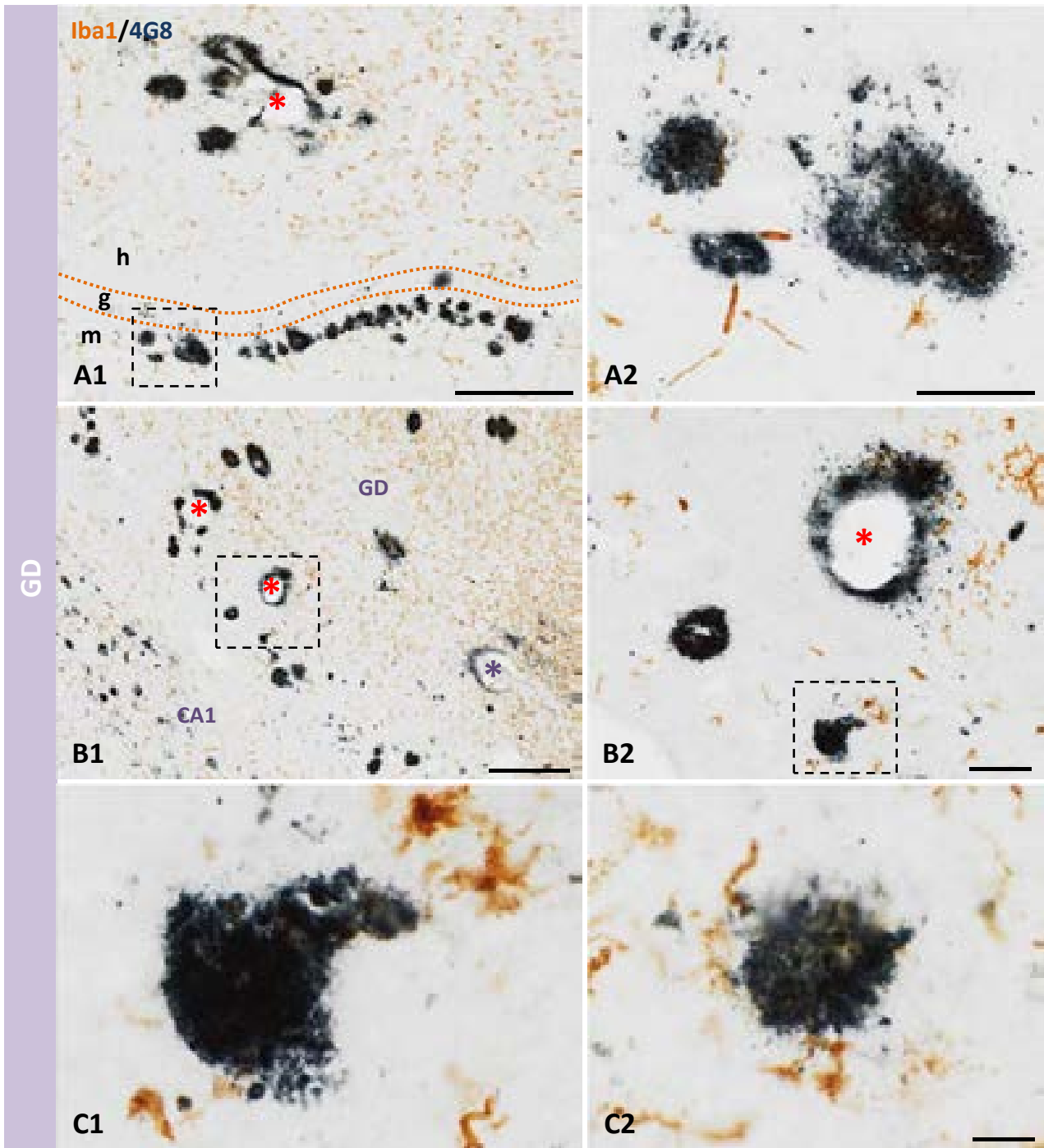


Figura 3.3.19. El giro dentado de los pacientes de Alzheimer (Braak V-VI) presenta áreas despobladas de microglía, incluso en las zonas más próximas a las placas de A β . Inmunohistoquímica doble para A β (4G8, azul oscuro) y microglía (Iba1, marrón) en el GD de un paciente de Alzheimer. Las placas amiloides concentradas en la capa molecular de este individuo (A1) y en general, en regiones cercanas a vasos sanguíneos (B1), presentan escasas células microgliales alrededor (ver detalles ampliados en A2 y B2, asteriscos indican vasos sanguíneos). Además, la escasa microglía presente muestra características morfológicas patológicas (C1 y C2). Barra de escala: A1-B1: 500 μ m; A2-B2: 100 μ m; C1-C2: 20 μ m.

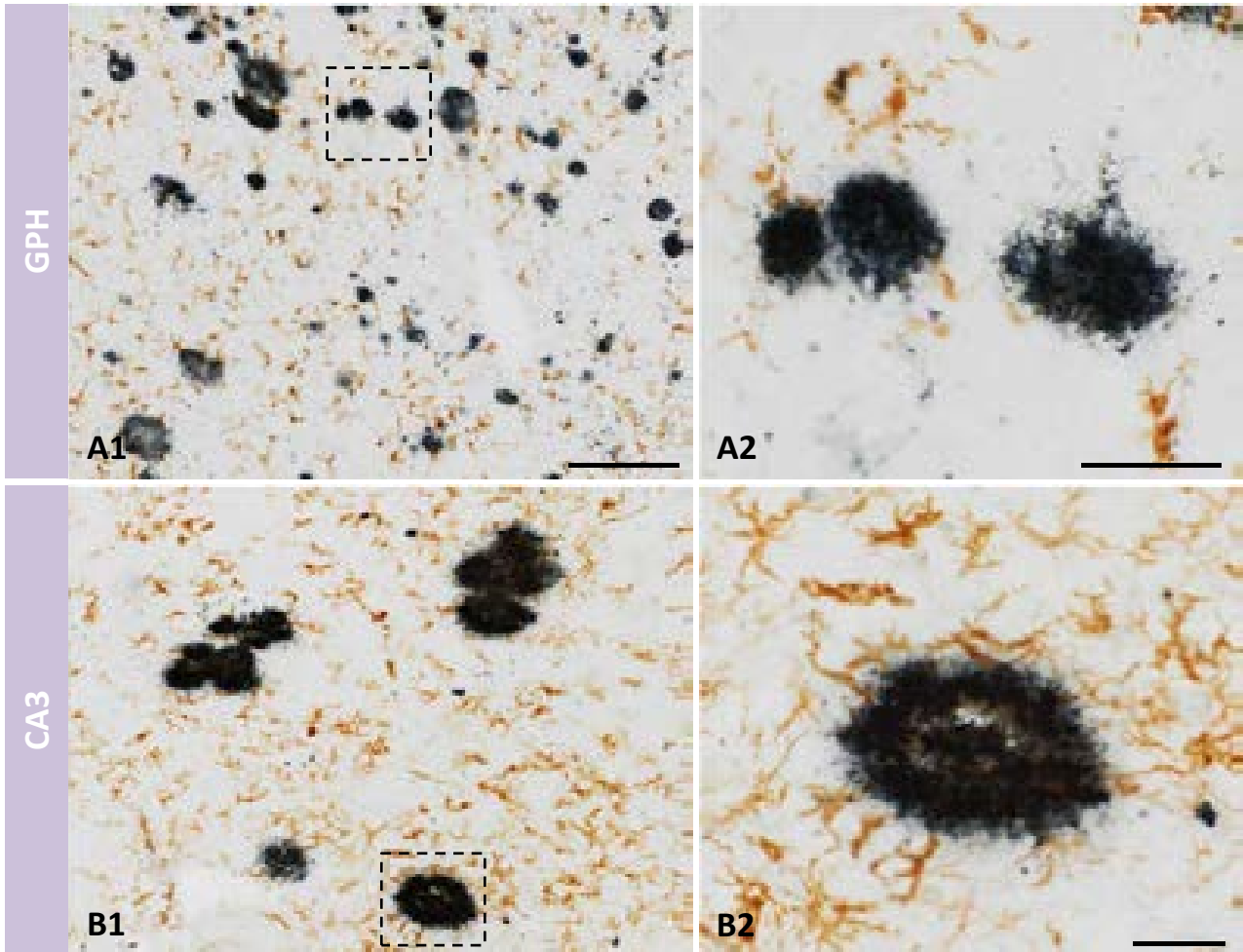


Figura 3.3.20. Al igual que ocurre en el giro dentado, en algunas regiones del hipocampo propio y del giro parahipocampal de pacientes Braak V-VI se encuentran áreas despobladas de microglía, incluso en las zonas más próximas al A β . Inmunohistoquímica doble para A β (4G8, azul oscuro) y microglía (Iba1, marrón) en el GPH (A) y la región CA3 (B) de un paciente con la enfermedad Alzheimer. Aunque no todas las regiones se comportan como el GD de este mismo individuo (previamente analizado), en el GPH también se observan placas desprovistas de células microgliales (A1, detalle ampliado en A2). Las imágenes tomadas en CA3 indican que no todos los depósitos amiloides presentan el mismo efecto en las células microgliales (B1). En B2 puede observarse una gran cantidad de células Iba1-positivas alrededor de una placa de A β . Barra de escala: A1-B1: 200 μ m; A2-B2: 50 μ m.

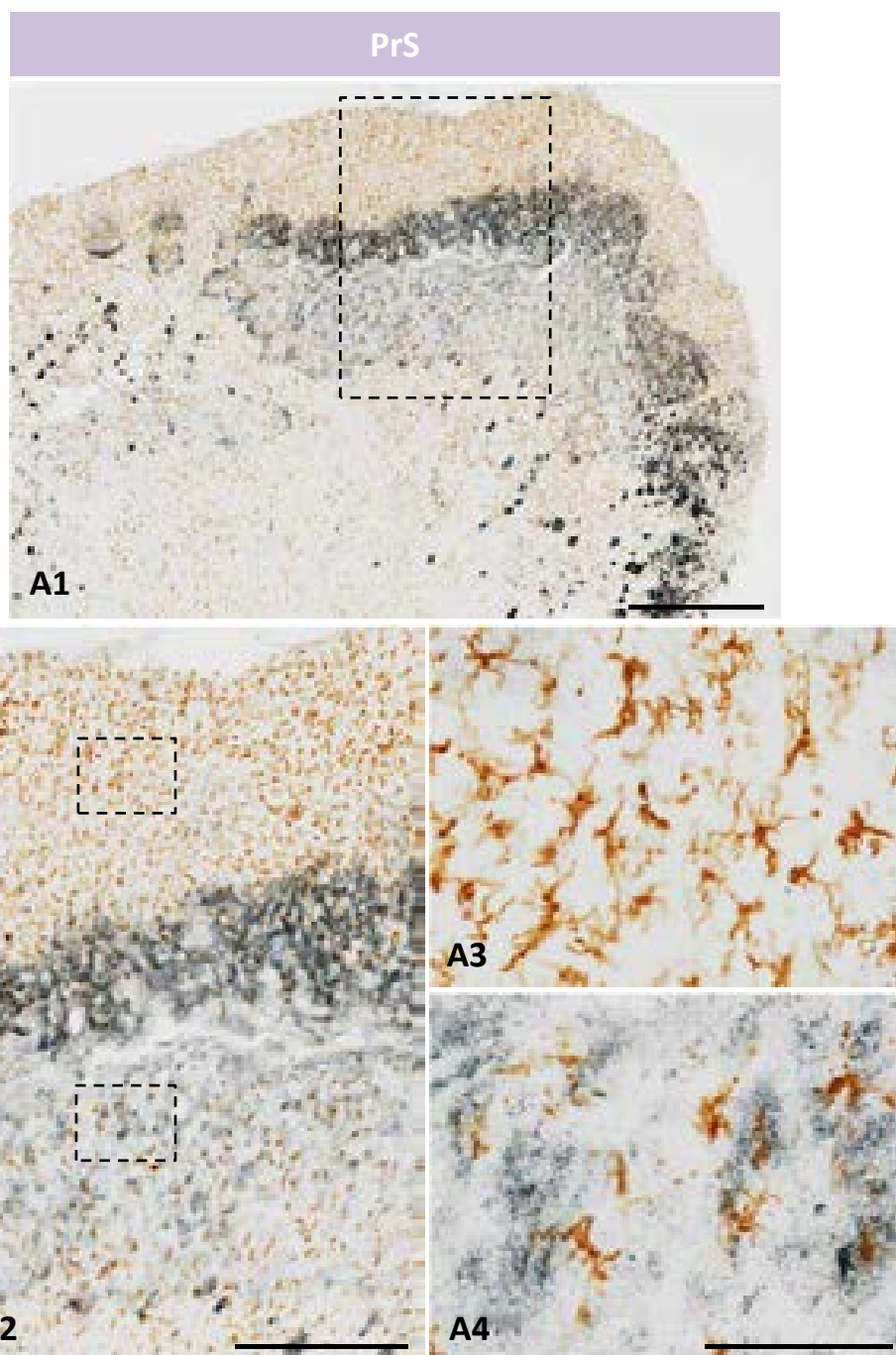


Figura 3.3.21. Efecto del A β sobre la población microglial en el Presubículo (PrS) de un individuo Braak V-VI. El patrón de inmunorreactividad para A β en el PrS (A1, detalle ampliado en A2) permite comparar el estado morfológico que exhibe la microglía en esta región cortical: aparentemente sana en la región sin A β (A3), y con apariencia patológica/fragmentada la que se encuentra en contacto con el péptido amiloide (A4). Barra de escala: A1: 1 mm; A2: 500 μ m; A3-A4: 100 μ m.

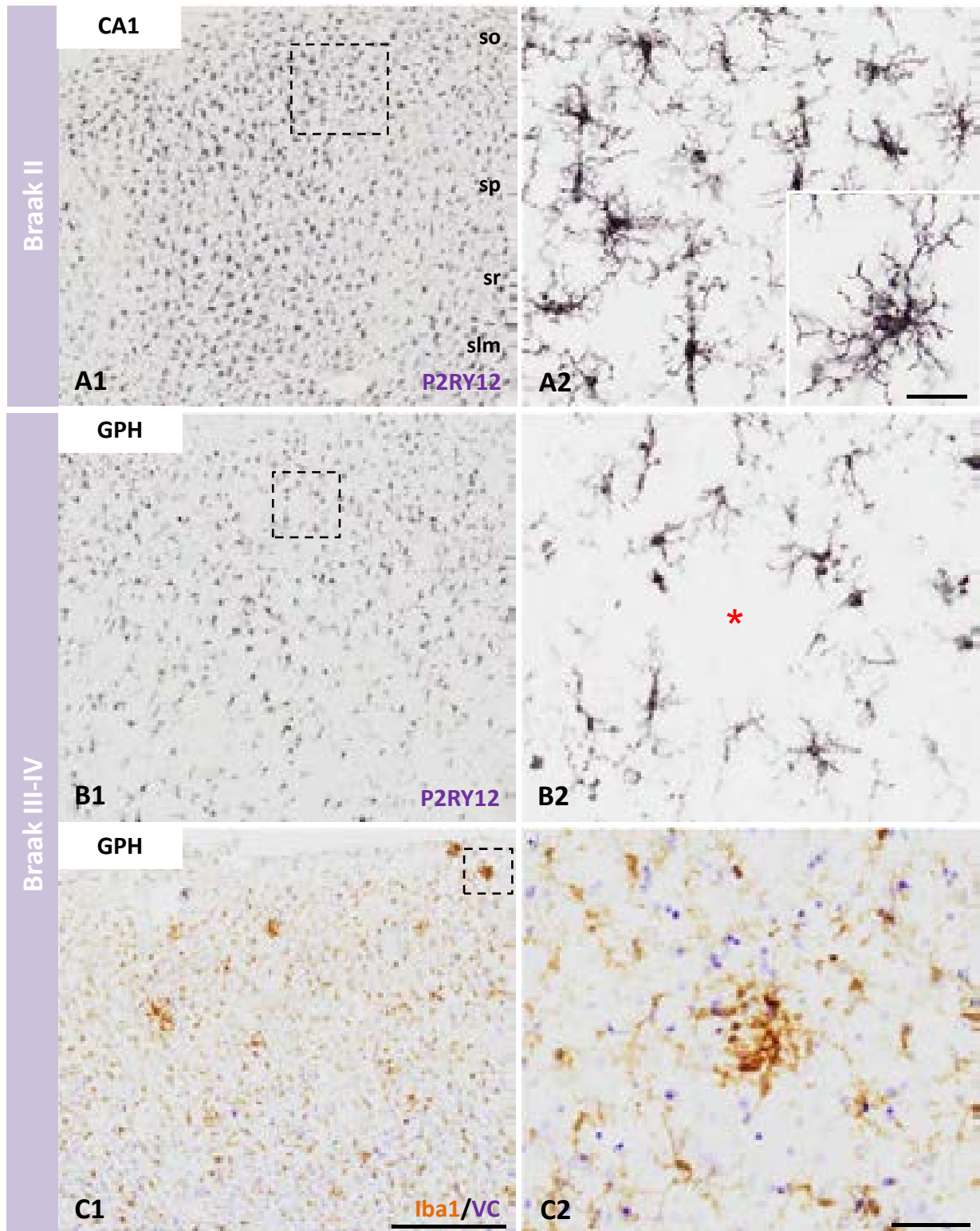


Figura 3.3.22. P2ry12 es un marcador de la población de microglia no reactiva. Estudio inmunohistoquímico comparativo de los marcadores microgliales P2ry12 (A y B) e Iba1 (C) en muestras humanas en estadios Braak II (A) y Braak V-VI (B y C). En los individuos Braak II las células microgliales P2ry12-positivas muestran un fenotipo no reactivo característico (ver inserto en A2) y se distribuyen homogéneamente a lo largo de toda las capas de la región CA1 (A1). A diferencia de lo observado con el marcador Iba1 (C), las células P2ry12-positivas de los pacientes Braak V-VI, no se agrupan alrededor de las placas de A β (B1, detalle ampliado en B2, asterisco indica centro de una placa), como sí lo hace la población celular Iba1-positiva. *so*: *stratum oriens*; *sp*: *stratum piramidale*; *sr*: *stratum radiatum*; *slm*: *stratum lacunosum-moleculare*. Barra de escala: A1-C1: 500 μ m; A2-C2: 50 μ m; inserto en A2: 20 μ m.

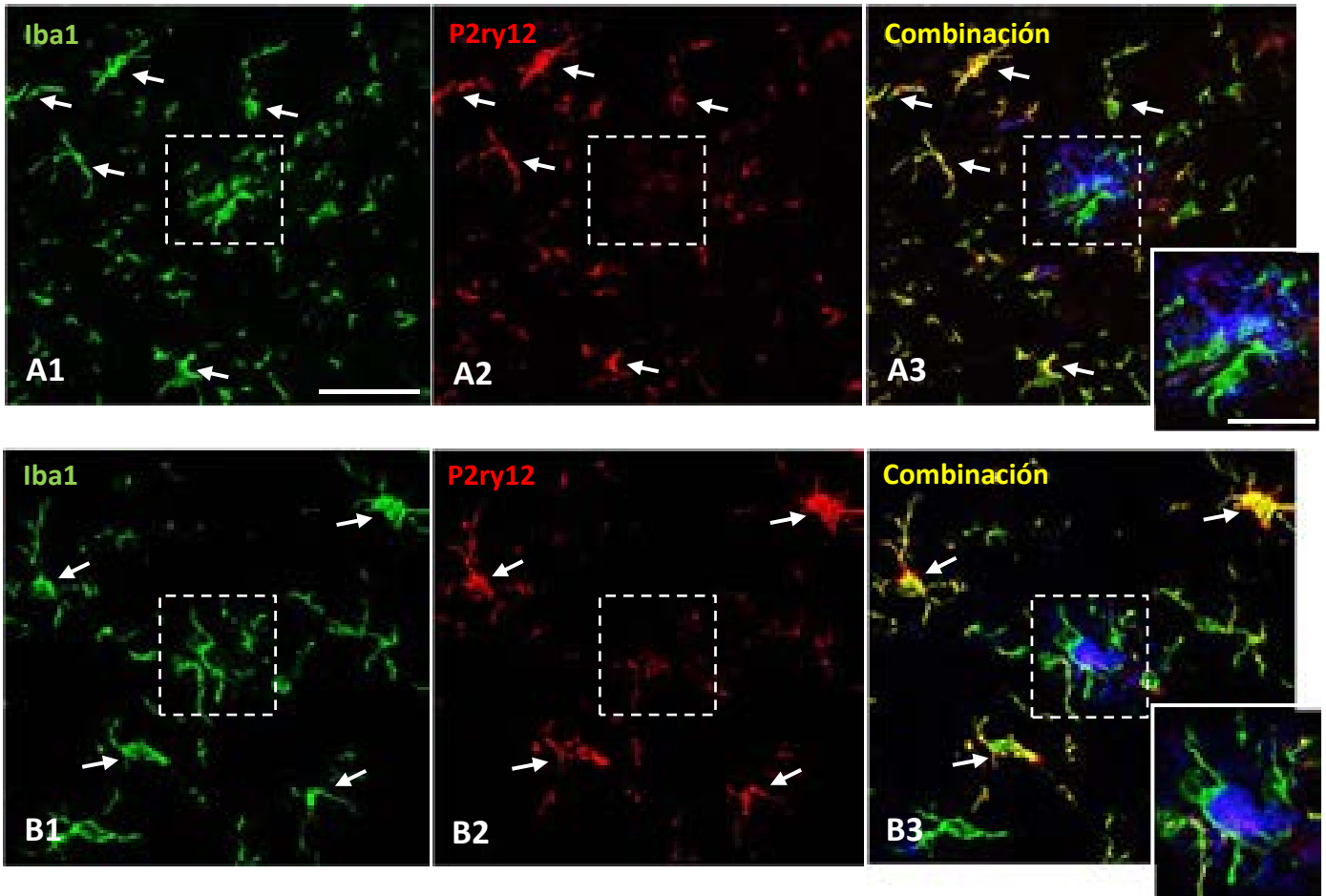


Figura 3.3.23. Las células microgliales activadas asociadas a los depósitos amiloides son negativas para el marcador P2ry12. Inmunofluorescencia triple para Iba1 (rojo), P2ry12 (verde) y A β (azul) en el GPH de pacientes Braak V-VI con la enfermedad de Alzheimer. En las imágenes de microscopía láser confocal se observa expresión de Iba1 tanto en las células microgliales asociadas a las placas amiloides (A1 y B1) como en las que se encuentran en regiones interplaca. Sin embargo, la población microglial P2ry12-positiva no se encuentra asociada a los depósitos de A β (A2 y B2). Las imágenes combinadas (A3 y B3) muestran que la microglía que se asocia al A β (azul) expresa el marcador Iba1 pero no P2ry12. Barra de escala: A y B: 50 μ m; inserto en A3 y B3: 20 μ m.

quiescente (Fig. 3.3.23 A y B). Por tanto, la microglía reactiva asociada al A β presentó el fenotipo Iba1⁺/P2ry12⁻.

Tras demostrar que, la microglía reactiva no expresa el receptor purinérgico P2ry12, pretendimos resolver si las células microgliales quiescentes, en concreto, se encontraban afectadas por el proceso de degeneración microglial observado previamente con el marcador general de microglía Iba1. Para ello, se realizó un estudio inmunohistoquímico para P2ry12 en el giro dentado, CA1 y la corteza perirrinal de casos Braak II y casos severos Braak V-VI (Fig. 3.3.24 A-C y D-F, respectivamente). Las células P2ry12 de los individuos en estadio leve mostraron, de nuevo, un gradiente de densidad en las regiones analizadas (de mayor a menor: GD, CA1 y GPH). Además, presentaron una morfología no patológica y una distribución homogénea en las tres regiones analizadas (Fig. 3.3.24 A1-C1, detalles ampliados en A2-C2). Sin embargo, en los individuos dementes Braak V-VI, se apreció una disminución del área inmunorreactiva y ausencia de agrupaciones alrededor de los depósitos de A β en todas las regiones analizadas (Fig. 3.3.24 D1-F1, detalles ampliados en D2-F2).

Así mismo, el ensayo cuantitativo de la carga de células P2ry12 inmunopositivas, tanto en el hipocampo como en el giro parahipocampal, de los pacientes de Alzheimer mostró cambios significativos con respecto a los individuos Braak II (Fig. 3.3.24 G). Específicamente, se obtuvo una disminución del 60% en el giro dentado (% área P2ry12-positiva, Braak II: 19,01 \pm 4,01; Braak III-IV: 11,79 \pm 7,94; Braak V-VI: 7,52 \pm 5,55) y del 45% en la región CA3 (Braak II: 12,77 \pm 2,85; Braak III-IV: 10,26 \pm 5,61; Braak V-VI: 6,96 \pm 4,80). En la región CA1 la disminución fue del 41% (Braak II: 10,20 \pm 2,43; Braak III-IV: 9,75 \pm 4,33; Braak V-VI: 6,05 \pm 2,53) y finalmente, en la corteza perirrinal del 46% (Braak II: 5,31 \pm 2,06; Braak III-IV: 6,56 \pm 2,94; Braak V-VI: 2,85 \pm 1,50).

Estos datos demuestran la pérdida de microglía inmunopositiva para P2ry12 en todas las regiones analizadas.

Por último, el análisis cuantitativo de los niveles de expresión de ARNm del receptor de fractalquina (CX3CR1, marcador de microglía residente/quiescente) (Fig. suplementaria 3.6 A) y del receptor purinérgico P2ry12 (Fig. suplementaria 3.6 B), mostraron una disminución significativa en los pacientes de Alzheimer, en comparación con los controles y con los individuos Braak II de la misma edad. Además, ambos marcadores de microglía residente/no reactiva se correlacionaron positivamente a lo largo de los estadios de Braak (Fig. suplementaria 3.6 C). Estos datos, obtenidos en colaboración con el Dr. Javier Vitorica, apoyan los resultados obtenidos en los estudios inmunohistoquímicos.

Los diferentes fenotipos microgliales observados, tanto en las muestras humanas como en el modelo transgénico APP/PS1, han sido resumidos y ejemplarizados en la figura 3.3.25. Brevemente, la microglía del ratón APP/PS1 mostró dos fenotipos claramente diferenciados: 1) no reactivo (Fig. 3.3.25 A), y 2) activado (asociado a las placas de A β), con sobreexpresión de Iba1 (Fig. 3.3.25 B y D) y CD45 (Fig. 3.3.25 C). Los individuos Braak II exhibieron un típico estado quiescente, positivo para Iba1

(Fig. 3.3.25 I) y P2ry12 (Fig. 3.3.25 E). Sin embargo, la microglía de los individuos dementes Braak V-VI, aun mostrando un fenotipo típico de activación P2ry12⁻/CD68⁺/CD45^{medium} (Fig. 3.3.25 F, K, G, respectivamente), no presentó la morfología típica de microglía reactiva (Fig. 3.3.25 J), observada tanto en el modelo animal como en el individuo control con un proceso neuroinflamatorio (Fig. 3.3.25 H y L).

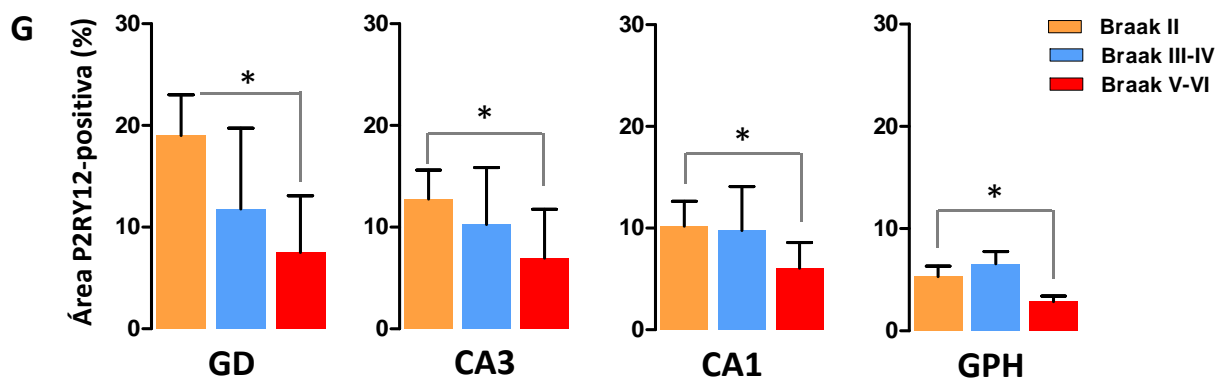
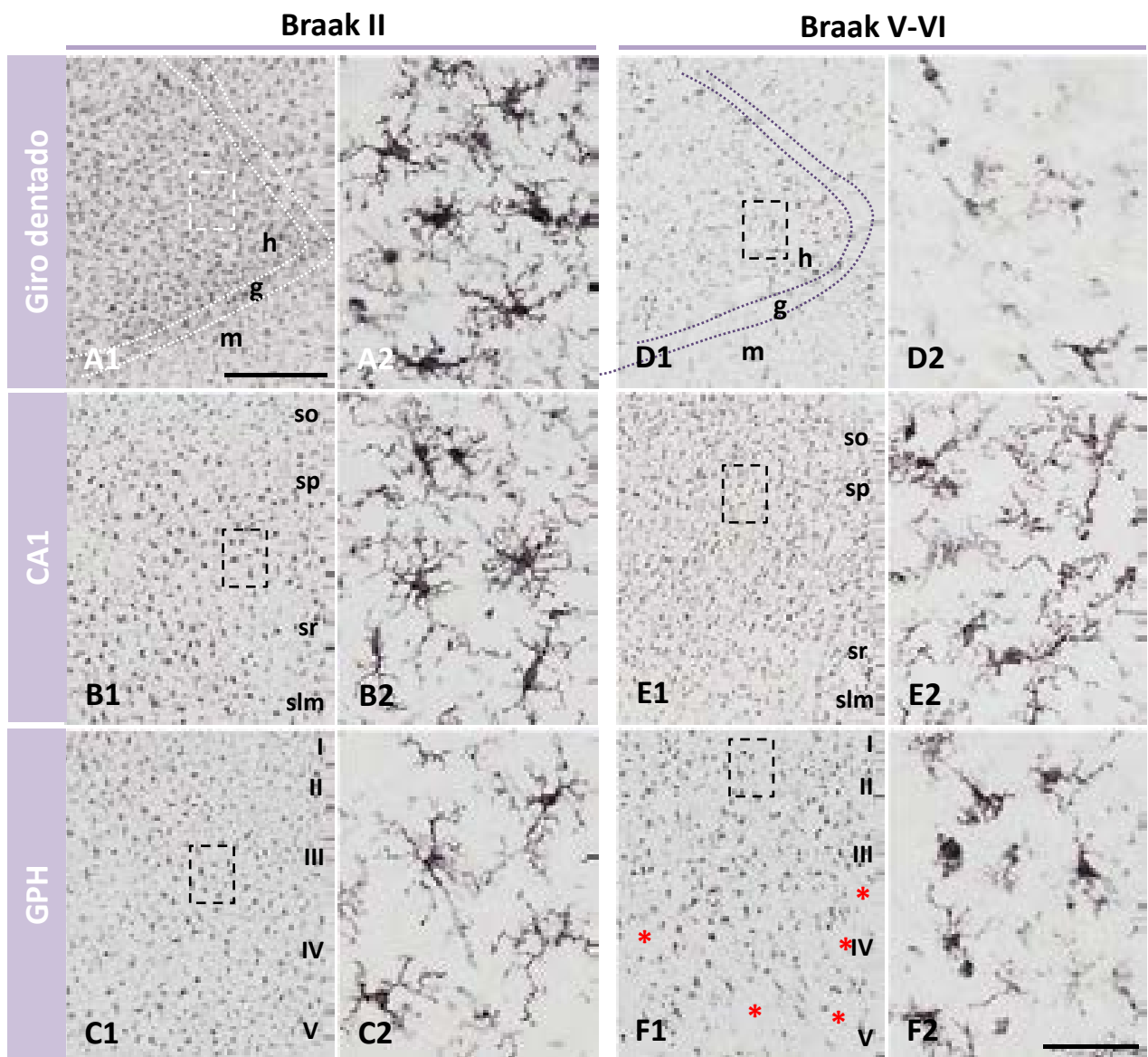
Habiendo puesto de manifiesto, mediante estudios cualitativos y cuantitativos, el proceso degenerativo que acontece en determinadas áreas del hipocampo de individuos con la enfermedad de Alzheimer, quisimos caracterizar en detalle el fenotipo senescente de las células microgliales empleando un análisis inmunohistoquímico con Iba1 (Fig. 3.3.26). Los principales rasgos morfológicos de la microglía degenerativa fueron: pérdida de ramificación (Fig. 3.3.26 D y E), fragmentación (Fig. 3.3.26 E y F), acortamiento de las prolongaciones (Fig. 3.3.26 G) y procesos distróficos (Fig. 3.3.26 H, I), tal y como muestran las imágenes representativas.

Para finalizar con este estudio comparativo empleando el marcador general de microglía Iba1, la serie de imágenes A-C de la figura 3.3.26 revela con claridad el ambiente senescente que se observa en el giro dentado de las muestras humanas Braak V-VI (Fig. 3.3.26 C) al compararla con la imagen tomada de un individuo Braak II (Fig. 3.3.26 A) o con la correspondiente al giro dentado del caso con neuroinflamación severa (Fig. 3.3.26 B).

Las células microgliales degenerativas presentan alteraciones en el metabolismo del hierro, acumulando grandes cantidades de ferritina. Por este motivo, decidimos analizar la expresión de la proteína ferritina en las muestras *post mortem* humanas (Fig. 3.3.27 y 3.3.28). El estudio inmunohistoquímico para el marcador de senescencia microglial ferritina mostró una mayor inmunotinción en la región CA1 de las muestras de los individuos dementes Braak V-VI, principalmente en el estrato oriens (Fig. 3.3.27 C1), en comparación con los individuos Braak II y Braak III-IV (Fig. 3.3.27 A1 y B1, respectivamente). Las imágenes de detalle A2-C2 de la figura 3.3.27 muestran que las células microgliales positivas para ferritina, efectivamente, presentaron rasgos morfológicos senescentes. Sin embargo, la microglía activada asociada a las placas de A β también exhibió una fuerte inmunotinción para este marcador (Fig. 3.3.27 D1-D4).

Mediante inmunohistoquímica doble para los marcadores Iba1 y ferritina en diferentes regiones del hipocampo y giro parahipocampal de pacientes de Alzheimer, se demostró que las células microgliales (Iba1-positivas) que se encontraban asociadas (infiltradas o rodeando) a las placas de A β , expresaban una gran cantidad de ferritina (Fig. 3.3.28 A2-C2). De todas las regiones analizadas, el subículo (Fig. 3.3.28 B1) y CA1 (Fig. 3.3.28 C1) fueron las que presentaron más inmunorreactividad para ferritina, en comparación con el giro dentado (Fig. 3.3.28 A1) o la corteza perirrinal (Fig. 3.3.28 D2).

También se analizó la presencia de ferritina en el modelo transgénico APP/PS1 (Fig. 3.3.28 E) y al igual que ocurrió en las muestras humanas, los ratones transgénicos de 12 meses de edad mostraron abundante inmunotinción para ferritina alrededor de los depósitos de β -amiloide (Fig. 3.3.28 E2).



N=5-7; GD: ADEVA de una vía; $F(2, 15) = 5,115$; $P = 0,020$; Test de Bonferroni; CA3, CA1 y GPH: *t*-test, $*p < 0,05$

Figura 3.3.24. La población microglial P2ry12-positiva se encuentra afectada en el hipocampo y giro parahipocampal de los pacientes dementes Braak V-VI. Inmunohistoquímica para P2ry12 en el GD, CA1 y GPH de casos Braak II (A, B y C, respectivamente) e individuos dementes (D, E y F, respectivamente). Las células microgliales P2ry12-positivas muestran una morfología no patológica (A2-C2) y una distribución homogénea a lo largo de todo el GD (A1), CA1 (B1) y GPH (C1) en los individuos de estadio leve, a diferencia de lo que se observa en los individuos Braak V-VI, donde se aprecia una disminución del área inmunorreactiva (D1-F1) y ausencia de agrupaciones alrededor de los depósitos amiloides (D2-F2, asteriscos indican placas de A β). G) El análisis cuantitativo del área inmunomarcada con P2ry12 en los individuos Braak V-VI muestra una disminución significativa con respecto a los individuos de estadio leve en todas las regiones estudiadas. *m*: capa molecular; *g*: capa granular; *h*: capa polimórfica o hilio. Barra de escala:A1-F1: 500 μ m; A2-F2: 50 μ m.

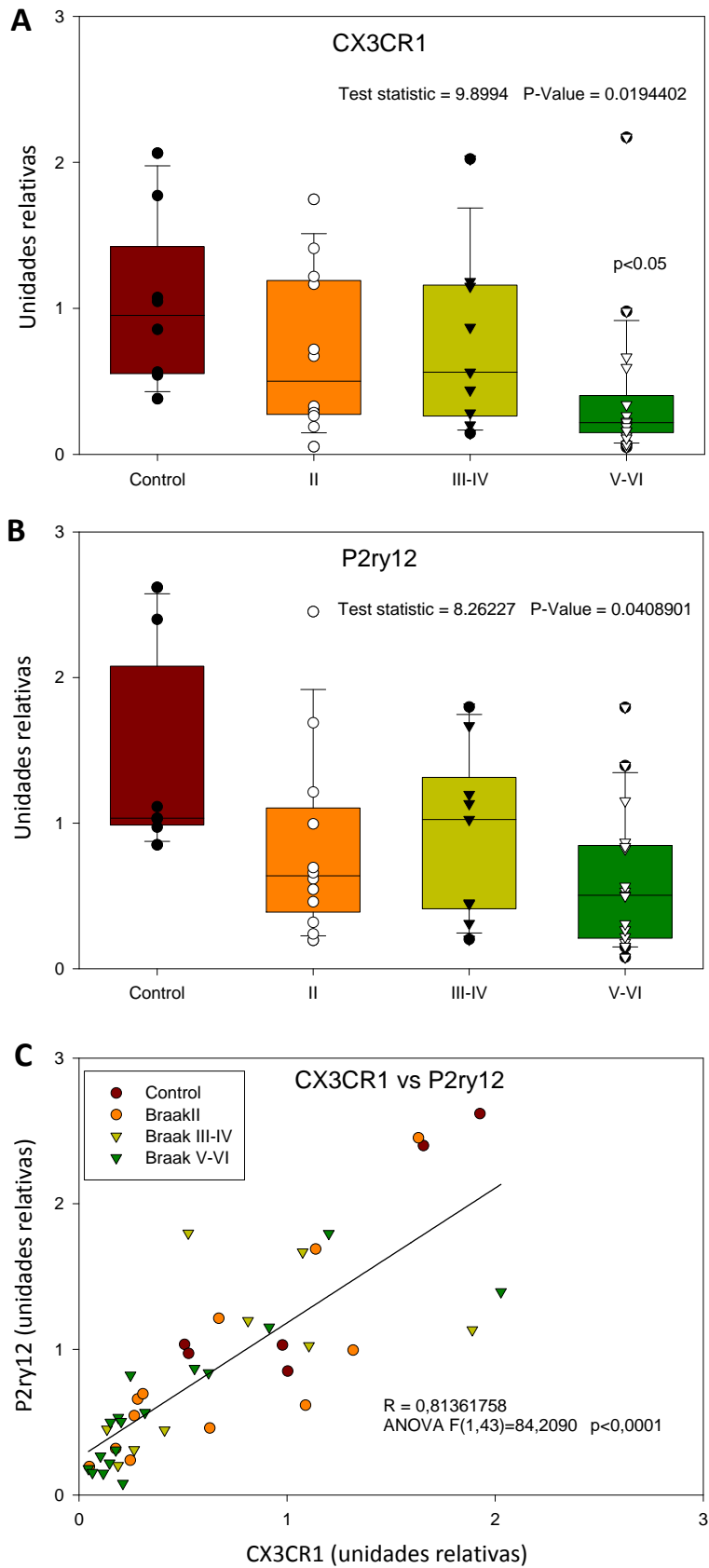


Figura Suplementaria 3.6. La expresión de marcadores de microglía no reactiva se reduce significativamente en el hipocampo y giro parahipocampal de los pacientes de Alzheimer. El análisis cuantitativo por PCR de la expresión de ARNm de CX3CR1 (A) y P2ry12 (B) muestra una bajada significativa en los individuos Braak V-VI en comparación con los controles y Braak II de la misma edad. Ambos marcadores se correlacionan positivamente a lo largo de la enfermedad (C). Resultados obtenidos en colaboración con el Dr. Javier Vitorica de la Universidad de Sevilla.

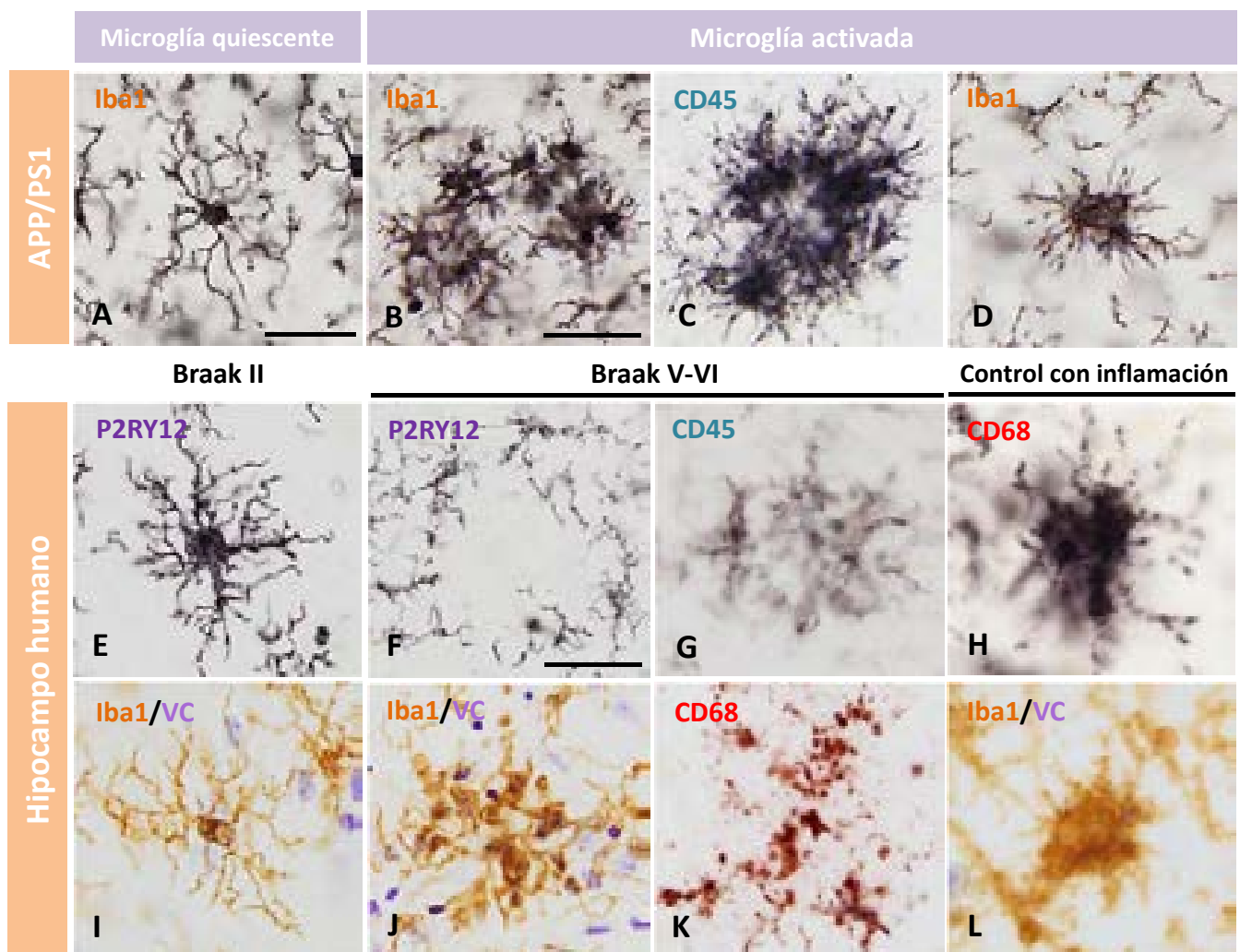


Figura 3.3.25. Reducida reactividad microglial en los pacientes de Alzheimer. Estudio inmunohistoquímico comparativo de los diferentes morfotipos y fenotipos microgliales en el modelo APP/PS1 (A-D), en el hipocampo de un individuo Braak II (E, I), de un individuo con neuroinflamación no asociada al Alzheimer (H y L) y de un caso Braak V-VI (F, G, J y K). Las células microgliales del ratón transgénico muestran dos fenotipos claramente diferenciados: no reactivo (A) y activado (B-D), al igual que ocurre con los individuos de estadio inicial Braak II (E, I). Sin embargo, la microglía de los individuos dementes, aún expresando marcadores típicos de activación (K) no adquiere el clásico morfotipo de microglía activada, observado en el ratón (B, C y D) o en el individuo control con un proceso neuroinflamatorio (H, L). Barra de escala: A-D-E-I-H-L: 20 µm; B-CG-J-K: 50 µm; F: 100 µm.

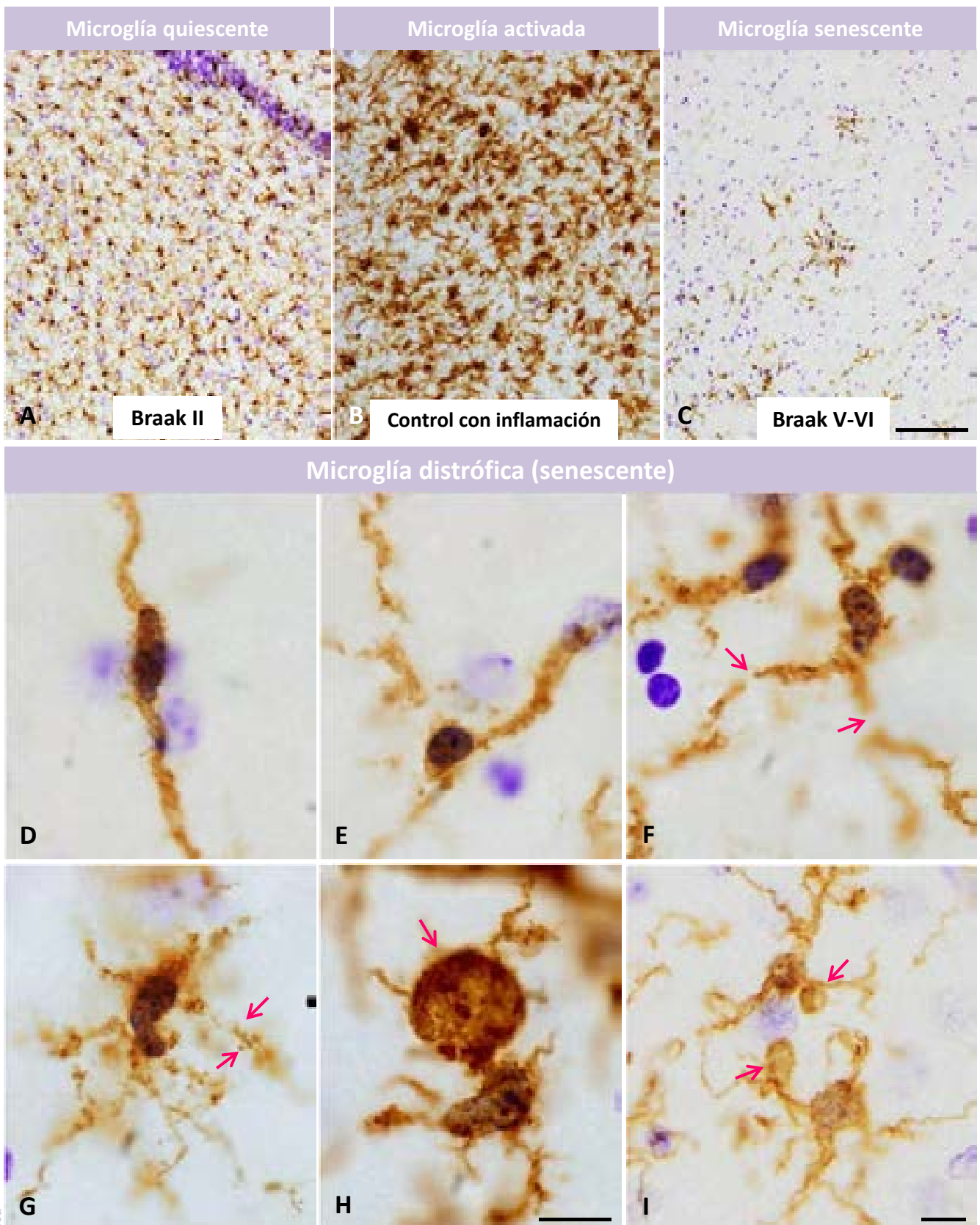
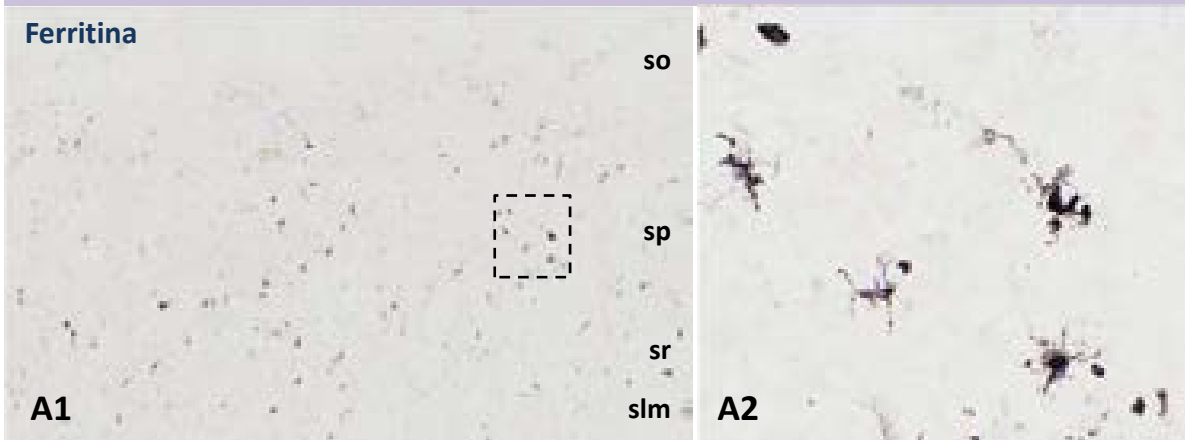


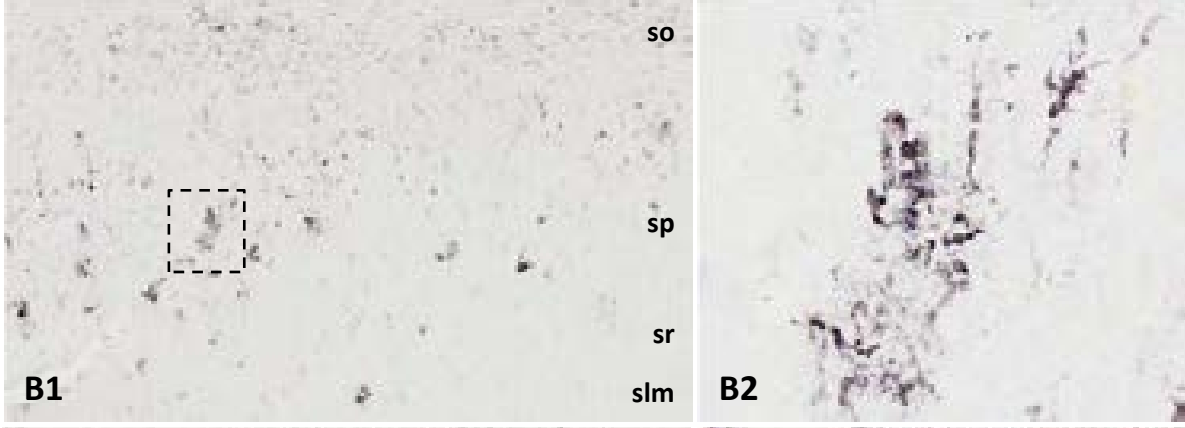
Figura 3.3.26. La microglía del giro dentado de la mayoría de los pacientes de Alzheimer presenta características morfológicas degenerativas. Inmunohistoquímica para Iba1 contrateñida con violeta de cresilo en el GD de individuos Braak II (A), Braak V-VI (C, D-I) y un caso control con neuroinflamación (B). La serie de imágenes comparativas A-C muestra claramente el ambiente de senescencia microglial que acontece en el GD de los casos dementes. Las imágenes de detalle exhiben diferentes rasgos senescentes: desramificación (D y E), fragmentación (E y F, flechas indican fracturas), acortamiento de las prolongaciones (G) y distrofias (H e I). Barra de escala: A-C: 100 μ m; D-I: 10 μ m.

CA1

Braak II



Braak III-IV



Braak V-VI

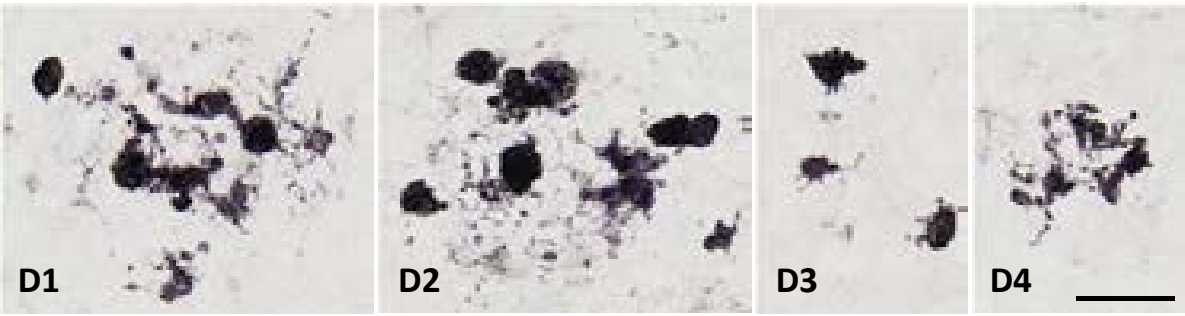
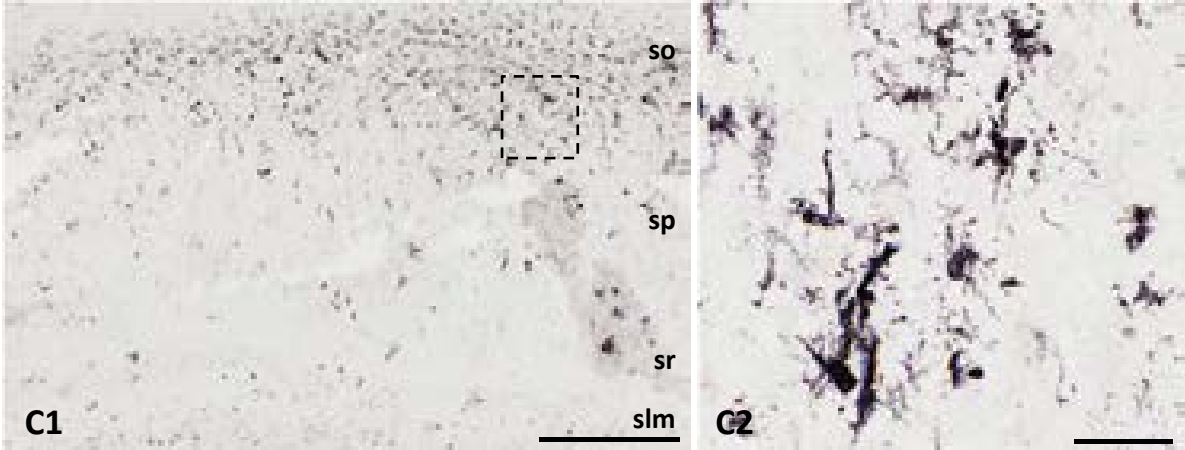
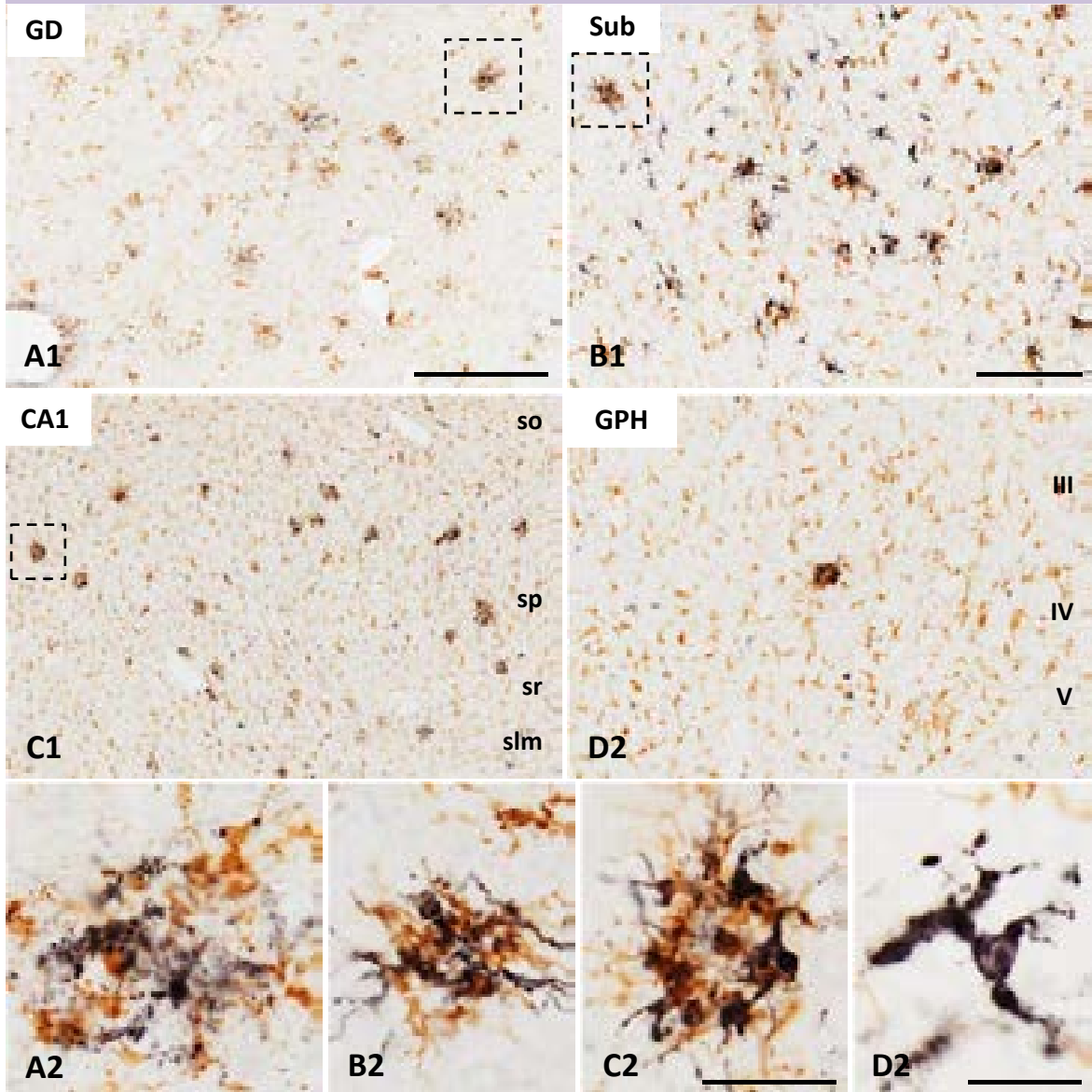


Figura 3.3.27. La expresión de ferritina se incrementa en la región CA1 a lo largo de los estadios de Braak. El análisis inmunohistoquímico para el marcador de senescencia microglial ferritina muestra una mayor inmunotinción en las muestras Braak V-VI (C1) en comparación con las muestras Braak II (A1) y Braak III-IV (B1, D). Además de la microglía senescente (detalles en A2-C2), las células microgliales asociadas a las placas amiloides también son positivas para ferritina (ver detalles D1-D4). *so*: *stratum oriens*; *sp*: *stratum pyramidale*; *sr*: *stratum radiatum*; *slm*: *stratum lacunosum-moleculare*. Barra de escala: A1-C1: 500 μ m; A2-C2: 50 μ m; D1-D4: 50 μ m.

Braak V-VI



APP/PS1

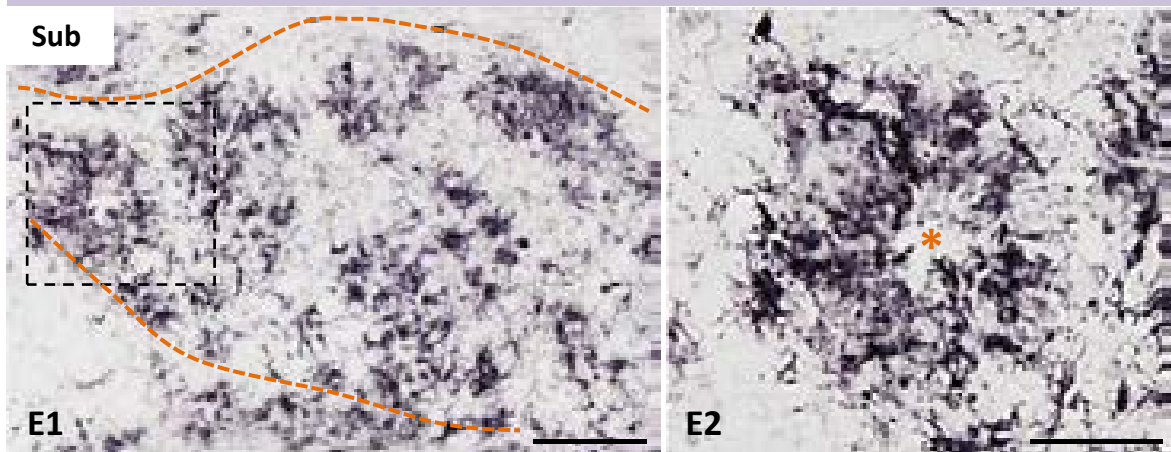


Figura 3.3.28. La microglía asociada a los depósitos amiloides expresa una gran cantidad de ferritina en las muestras *postmortem* de pacientes de Alzheimer y modelos APP/PS1. Inmunohistoquímica doble para Iba1 (marrón) y ferritina (azul oscuro) en el GD (A), subículo (B), CA1 (C) y GPH (D) de individuos en estadio avanzado Braak V-VI. Además de microglía con apariencia senescente (D2), las células microgliales que se agrupan y/o infiltran en las placas son positivas para ferritina (ver imágenes de detalle A2-C2). Los ratones APP/PS1 de 12 meses de edad manifiestan una enorme inmunotinción para ferritina alrededor de los depósitos de A β (E1, detalle ampliado en E2, asterisco indica placa). *so*: *stratum oriens*; *sp*: *stratum pyramidale*; *sr*: *stratum radiatum*; *slm*: *stratum lacunosum-moleculare*. Barra de escala: A1-C1: 500 μ m; B1-D2: 200 μ m; A2-C2: 50 μ m; D2: 20 μ m; E2: 50 μ m; E1: 100 μ m.

Por consiguiente, según los resultados obtenidos, podríamos determinar que el marcador de senescencia microglial ferritina se sobreexpresa también en la microglía reactiva que se encuentra asociada a las placas amiloides.

Debido al proceso degenerativo presentado en la población microglial de determinadas regiones del hipocampo y giro parahipocampal de los enfermos de Alzheimer, consideramos la posibilidad de que existiera proliferación microglial en un intento de compensar esta pérdida celular. Para ello, se analizó la expresión del marcador de proliferación celular Ki67 a lo largo de los estadios de Braak (Fig. 3.3.29). Mediante inmunohistoquímica, se observó un pequeño incremento en la cantidad de núcleos positivos para Ki67 en el parénquima nervioso de las muestras Braak V-VI (Fig. 3.3.29 D), en comparación con los observados en los individuos Braak II y Braak III-IV (Fig. 3.3.29 B y C, respectivamente). Sin embargo, el caso control con neuroinflamación mostró un número mucho mayor de núcleos proliferativos (Fig. 3.3.29 A). Además, se analizaron también los niveles de expresión de ARNm, mediante PCR, en las muestras humanas (estudio llevado a cabo en el laboratorio de la Universidad de Sevilla, dirigido por el Dr. Javier Vitorica). Aunque se evidenció una clara tendencia a incrementar con la progresión de la enfermedad, no se obtuvieron cambios significativos entre los estadios de Braak (Fig. 3.3.29 E).

Por tanto, la escasa proliferación celular que tuvo lugar en el hipocampo y giro parahipocampal de los pacientes de Alzheimer no pudo compensar la pérdida de las células microgliales.

3.3.5. Las fracciones solubles de hipocampo de pacientes de Alzheimer, y no de modelos APP/PS1, son tóxicas para la microglía *in vitro*

Finalmente, para comprobar la vulnerabilidad de la microglía en los pacientes frente a la de los modelos animales, se determinó *in vitro* la toxicidad de las fracciones solubles S1 obtenidas de hipocampo humano (individuos Braak II, Braak III-IV y Braak V-VI) y de modelos APP/PS1 (6 y 18 meses de edad) mediante citometría de flujo (Fig. suplementaria 3.7). Brevemente, las células microgliales (línea BV2) se incubaron durante 24 horas en presencia de 1 μ g de proteínas S1 (procedentes del hipocampo humano o de los animales transgénicos) y se determinó la toxicidad empleando *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit*. Este experimento permitió distinguir entre células intactas (cuadrante Q3; que fueron Annexin V-FITC e Ioduro de propidio negativas (IP)), células en apoptosis “temprana” (las que se encontraron en el cuadrante Q4; que fueron positivas para Annexin V-FITC y negativas para PI) y células en apoptosis tardía o muertas (las que se localizaron en el cuadrante Q2; que fueron positivas para Annexin V-FITC y para PI). El cuadrante Q1 reflejó daño necrótico.

Como se muestra en la figura suplementaria 3.7 A1-A4, las células Bv2, de origen microglial, sufrieron un proceso apoptótico tras el tratamiento con las fracciones S1 procedentes de los pacientes dementes Braak V-VI (Fig. suplementaria 3.7 A2). Por el contrario, el mismo tratamiento con S1 de las muestras Braak II (Fig. suplementaria 3.7 A1) o Braak III-IV (no mostrado), no afectó a la

población microglial. Cuando se inmunodepletó la fracción S1 de individuos Braak V-VI con el anticuerpo 6E10 (para el Abeta), no se modificó la viabilidad celular (Fig. suplementaria 3.7 A3). Por el contrario, la inmunodepleción con el anticuerpo AT8 (para fosfo-tau) de la misma fracción S1 bloqueó el efecto tóxico de esta fracción soluble sobre la microglía (Fig. suplementaria 3.7 A4). El mismo ensayo que se realizó en paralelo, pero empleando una línea celular de astrocitos (WJE), no mostró ningún efecto tóxico (Fig. suplementaria 3.7 B1 y B2). En cuanto a la fracción S1 del hipocampo de ratones APP/PS1 de 6 y 18 meses de edad (Fig. suplementaria 3.7 C1 y C2, respectivamente), no se observó ningún efecto tóxico para la microglía Bv2.

Estos datos, que fueron realizados en colaboración con el laboratorio del Dr. Vitorica, de la Universidad de Sevilla, corroboraron los resultados observados de degeneración microglial en el hipocampo y giro parahipocampal de pacientes de Alzheimer en contraposición con la extensa activación microglial mostrada por los ratones APP/PS1 durante la progresión de la enfermedad. Además, este estudio sugiere que no se trata del péptido A β sino de tau hiperfosforilado el responsable del declive microglial con la progresión de la enfermedad.

3.3.6. Reactividad astrogliar asociada al A β en el hipocampo y giro parahipocampal de los pacientes de Alzheimer

Los astrocitos desempeñan también un importante papel en la respuesta inflamatoria junto con la microglía, sin embargo hasta la fecha no se conoce el papel de la astrogliá reactiva en la patogénesis del Alzheimer. No se sabe si los astrocitos reactivos contribuyen a la patología de la AD mediante ganancia de función tóxica y/o pérdida de función, o si, por el contrario son protectores, o si poseen funciones diferentes según el estado de la patología y/o localización regional. Por ello, y tras identificar la existencia de un proceso de degeneración microglial en los pacientes de Alzheimer, se decidió estudiar la respuesta astrocitaria en las muestras humanas Braak II, Braak III-IV y Braak V-VI.

Para el estudio inmunohistoquímico de esta población glial se empleó el clásico anticuerpo para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína de los filamentos intermedios del citoesqueleto de los astrocitos, y que, aunque sea producida por todas las células astrocitarias, se sobreexpresa en el fenotipo reactivo. En imágenes panorámicas del hipocampo y giro parahipocampal de las muestras humanas analizadas, se observó un claro incremento generalizado de la marca inmunorreactiva para GFAP en los individuos dementes Braak V-VI (Fig. 3.3.30 B), en comparación con los casos leves Braak II (Fig. 3.3.30 A) y los estadios moderados Braak III-IV (no mostrado). Este aumento en la inmunotinción para GFAP en los pacientes Braak V-VI se localizaba en regiones discretas que parecían dibujar las placas de A β .

A continuación, se analizó en detalle el patrón regional de la reactividad astrocitaria a lo largo de la progresión de la enfermedad en las secciones humanas inmunoteñidas con anti-GFAP (Fig. 3.3.31). El giro dentado, y en concreto el hilio, presentó, desde las etapas iniciales de la patología, una gran densidad tanto de cuerpos astrocitarios como de prolongaciones GFAP-positivas por la

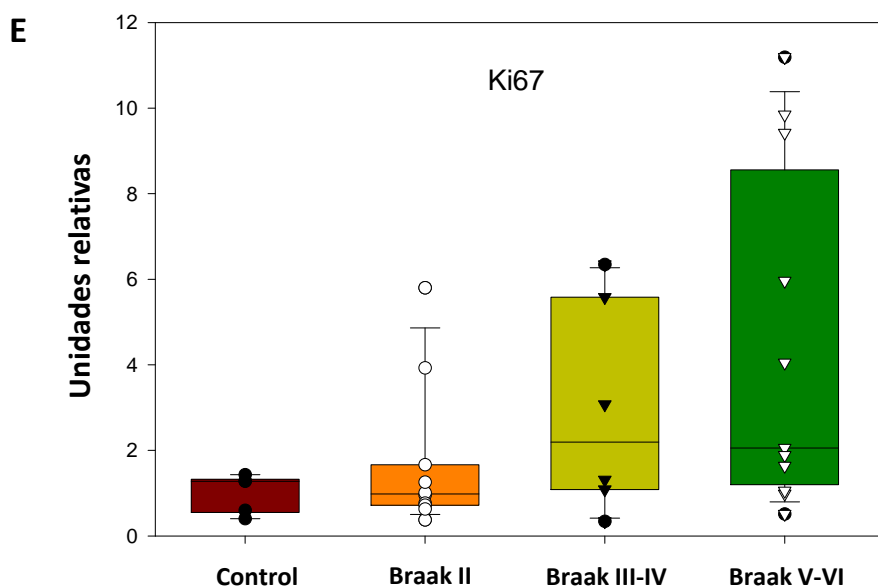
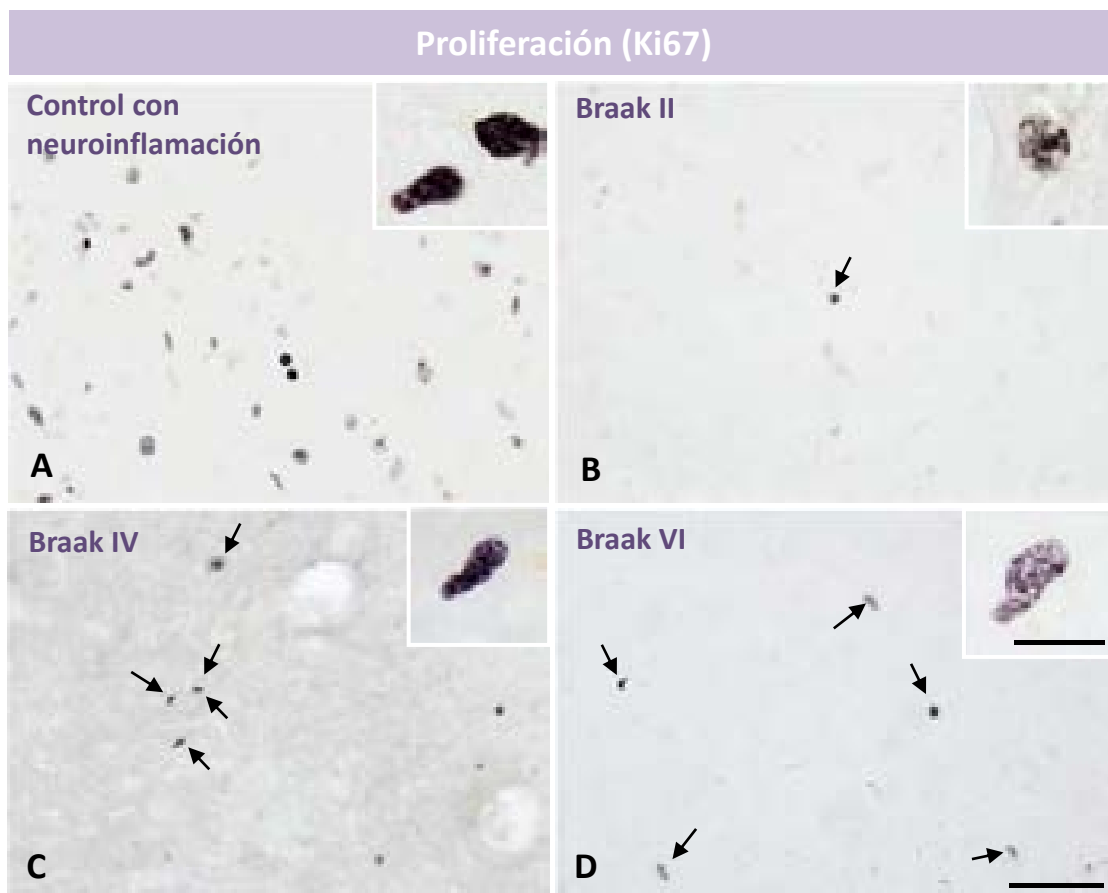
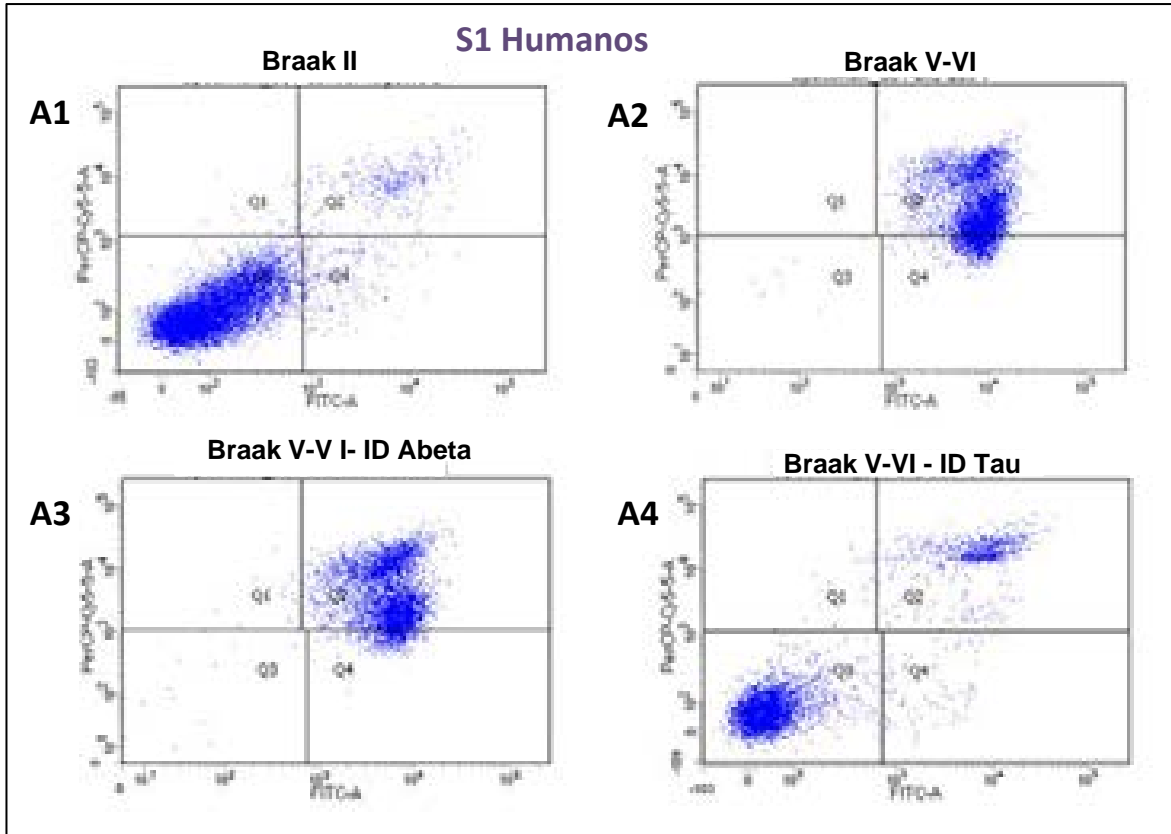
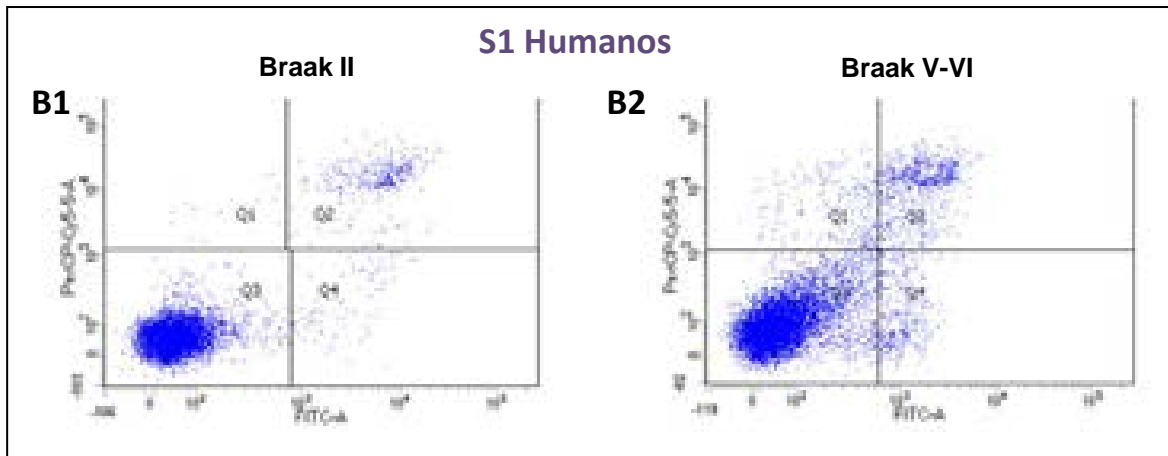


Figura 3.3.29. Escasa proliferación celular en el hipocampo y giro parahipocampal de los enfermos de Alzheimer. El análisis inmunohistoquímico para el marcador de proliferación celular Ki67 muestra un pequeño incremento de núcleos positivos en las muestras Braak V-VI (D, flechas indican núcleos), en comparación con los observados en los casos Braak II (B) y Braak III-IV (C), aunque muy por debajo de los observados en el caso control con inflamación (A). E) Sin embargo, el estudio cuantitativo de la expresión de ARNm no muestra diferencias significativas entre los estadios de Braak (Datos cedidos por el Dr. Javier Vitorica de la Universidad de Sevilla). Barra de escala: A-D: 50 μ m, insertos: 10 μ m.

MICROGLIA



ASTROGLIA



MICROGLIA

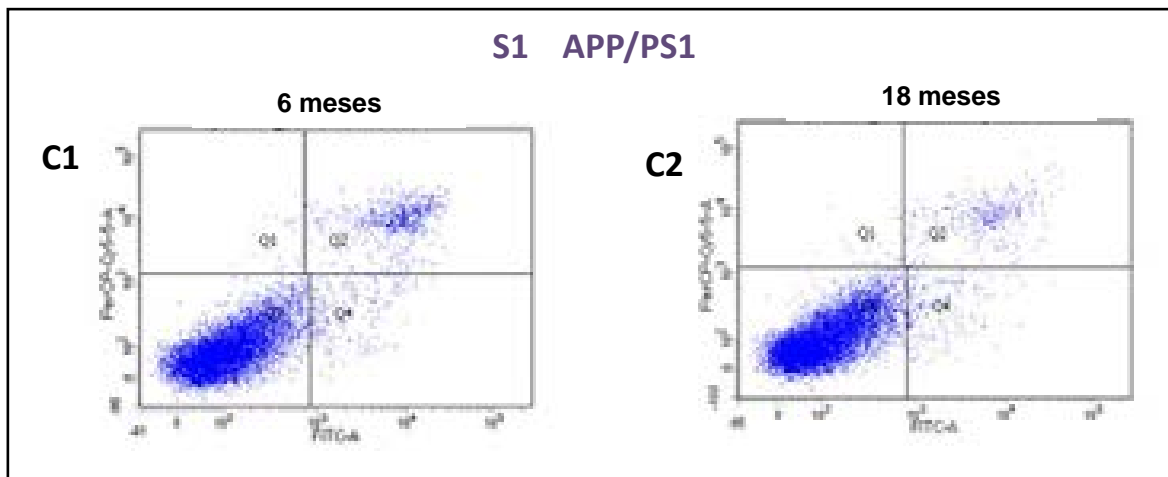


Figura suplementaria 3.7. La fracción S1 del hipocampo de individuos Braak V-VI produce un efecto tóxico específico sobre la microglía. A1-A4) Como se puede observar en la figura, las células de origen microglial Bv2 sufren un proceso apoptótico tras el tratamiento con las fracciones S1 de pacientes en fases avanzadas Braak VI (A2). El mismo tratamiento con S1 de muestras Braak II (A1) o Braak III-IV (no mostrado), no produce alteración de la población microglial. La inmunodepleción de la fracción S1 de individuos Braak V-VI con el anticuerpo 6E10 para Abeta no modificó la viabilidad celular (A3), sin embargo la inmunodepleción con el anticuerpo AT8 (fosfo-tau) de la fracción S1 de individuos Braak V-VI bloqueó el efecto tóxico de esta fracción soluble sobre la microglía (A4). B1-B2) El tratamiento en paralelo con las mismas fracciones S1 humanas de individuos Braak II y Braak V-VI utilizando una línea celular de astrocitos (WJE) no muestra ningún efecto tóxico. **La fracción S1 de hipocampo de ratones APP/PS1 no es tóxica para la microglía.** C1-C2) Por otra parte, fracciones S1 equivalentes, obtenidas a partir de hipocampo de modelos APP/PS1 de 6 o 18 meses de edad, no muestran ningún efecto tóxico para la microglía Bv2. Resultados obtenidos en colaboración con el Dr. Javier Vitorica de la Universidad de Sevilla.

totalidad de la capa polimórfica, distribuidos además de manera homogénea (Fig. 3.3.31 A1, detalle ampliado en A2). La región CA1 (Fig. 3.3.31 B1) y la corteza perirrinal del giro parahipocampal (3.3.31 C1) de los individuos Braak II, por el contrario, mostraron una débil inmunorreactividad para GFAP, que se limitó casi exclusivamente a las regiones perivasculares (Fig. 3.3.31 B2, C2 y C3) y a la capa limitante con la piamadre de la corteza. En los estadios avanzados Braak V-VI, los astrocitos del giro dentado se volvieron más reactivos, sobreexpresando GFAP y presentando un cuerpo celular y prolongaciones hipertróficas (ver detalle ampliado D2 de la figura 3.3.31); además, cambiaron su distribución espacial, organizándose alrededor de los depósitos de β -amiloide a lo largo de las tres capas del giro dentado (Fig. 3.3.31 D1). En CA1 y en la corteza del giro parahipocampal de los enfermos de Alzheimer se produjo un notable incremento en la inmunorreactividad para GFAP (Fig. 3.3.31 E1 y F1, respectivamente) asociado también a las placas de $A\beta$. Al igual que se observó en el giro dentado, estas regiones exhibieron también un cambio en la morfología de las células astrogliales reactivas, acumulando una gran cantidad de GFAP tanto en el cuerpo celular como en las prolongaciones (Fig. 3.3.31 E2 y F2).

Estos resultados fueron corroborados a nivel cuantitativo mediante análisis del área ocupada por los astrocitos (Fig. 3.3.32), marcados mediante inmunofluorescencia simple para GFAP (Fig. 3.3.32 E). El giro dentado de las muestras Braak III-IV y Braak V-VI presentó un incremento significativo de la carga astrogliar (del 53% y 61%, respectivamente) en comparación con los individuos en estadio inicial Braak II (Fig. 3.3.32 A). Resultados similares se obtuvieron en la cuantificación de la carga astrogliar en la región CA3 (aumento del 75% en Braak III-IV y del 80% en Braak VI, en comparación con Braak II) (Fig. 3.3.32 B). La región CA1 de los pacientes de Alzheimer mostró también crecimiento significativo en la inmunorreactividad en comparación con las muestras analizadas de los casos leves (81%) y moderados (89%) (Fig. 3.3.32 C). Sin embargo, la carga astrogliar no cambió significativamente en la corteza perirrinal a lo largo de los estadios de Braak (Fig. 3.3.32 D), seguramente debido a la variabilidad de la patología amiloide en el giro parahipocampal que se desarrolla desde etapas tempranas.

Debido a que los astrocitos de los individuos de etapas iniciales (Braak II), que se encontraban en estado de “reposo” o no reactivos, expresaron en general una cantidad reducida de GFAP, en ocasiones imperceptible por la técnica inmunohistoquímica, analizamos en estas muestras Braak II el marcador ALDH1L1 expresado de manera constitutiva en la población de células astrocitarias. Mediante inmunofluorescencia doble para microscopía láser confocal con GFAP y ALDH1L1 (Fig. 3.3.33) se determinó que ambos marcadores pueden ser detectados desde los estadios iniciales de la enfermedad (ver imagen combinada A3 y B3 en la figura 3.3.33). Sin embargo, la astrogliá reactiva exhibió una mayor inmunorreactividad para GFAP en comparación con su estado quiescente (Fig. 3.3.33 C2), mientras que el marcador constitutivo ALDH1L1 se expresó con la misma intensidad con independencia de su fenotipo (Fig. 3.3.33 C1 y C3).

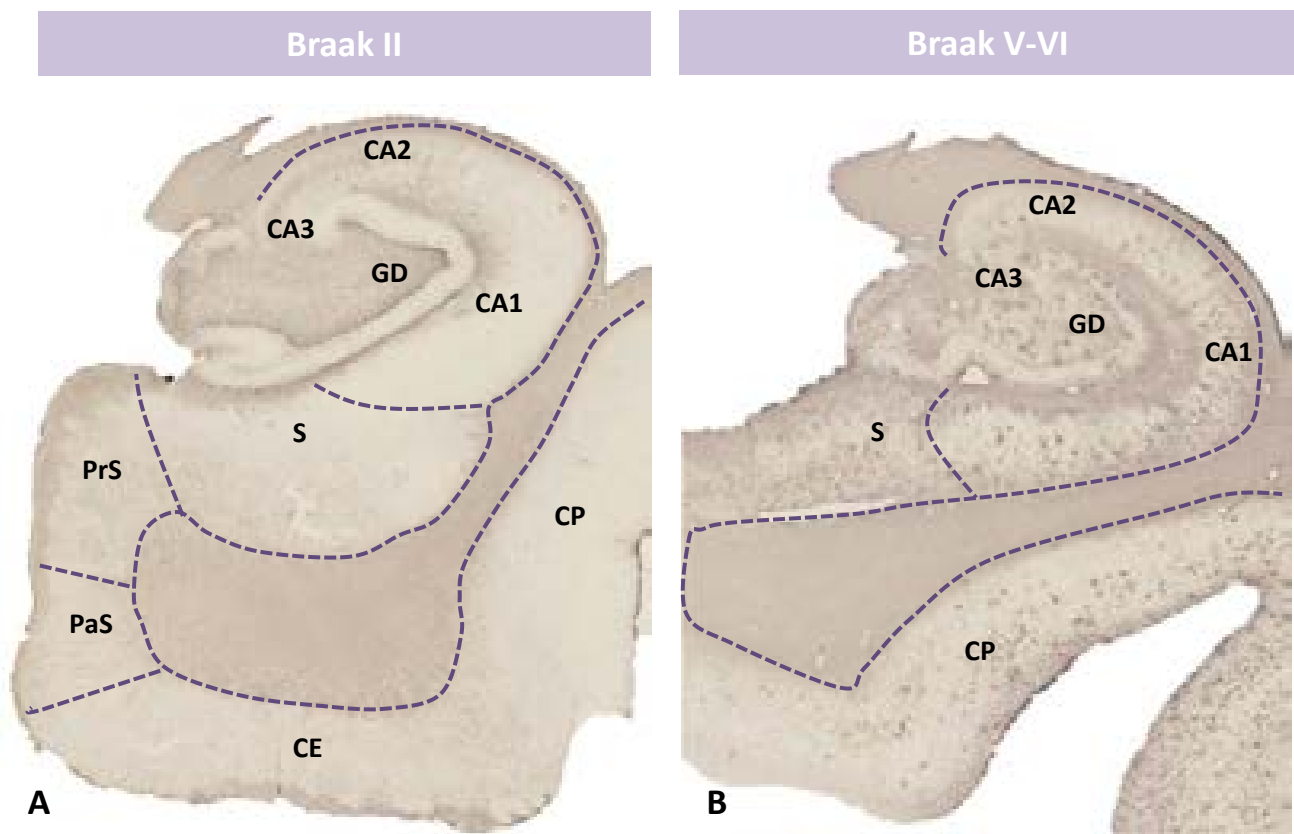


Figura 3.3.30. El hipocampo y el giro parahipocampal de los pacientes de Alzheimer presentan un aumento de la reactividad astrocitaria en comparación con los individuos de estadios leves. Mediante inmunohistoquímica para GFAP (marcador de astrocitos), se observa un incremento generalizado de la marca inmunorreactiva, aparentemente asociada a las placas de A β , en las muestras humanas de estadio avanzado Braak V-VI (B), en comparación con los casos Braak II de la misma edad (A). CA: *asta de Amón*; GD: *giro dentado*; S: *subículo*; PrS: *presubiculo*; PaS: *parasubiculo*; CE: *corteza entorrinal*; CP: *corteza perirrinal*. Barra de escala: 2 mm.

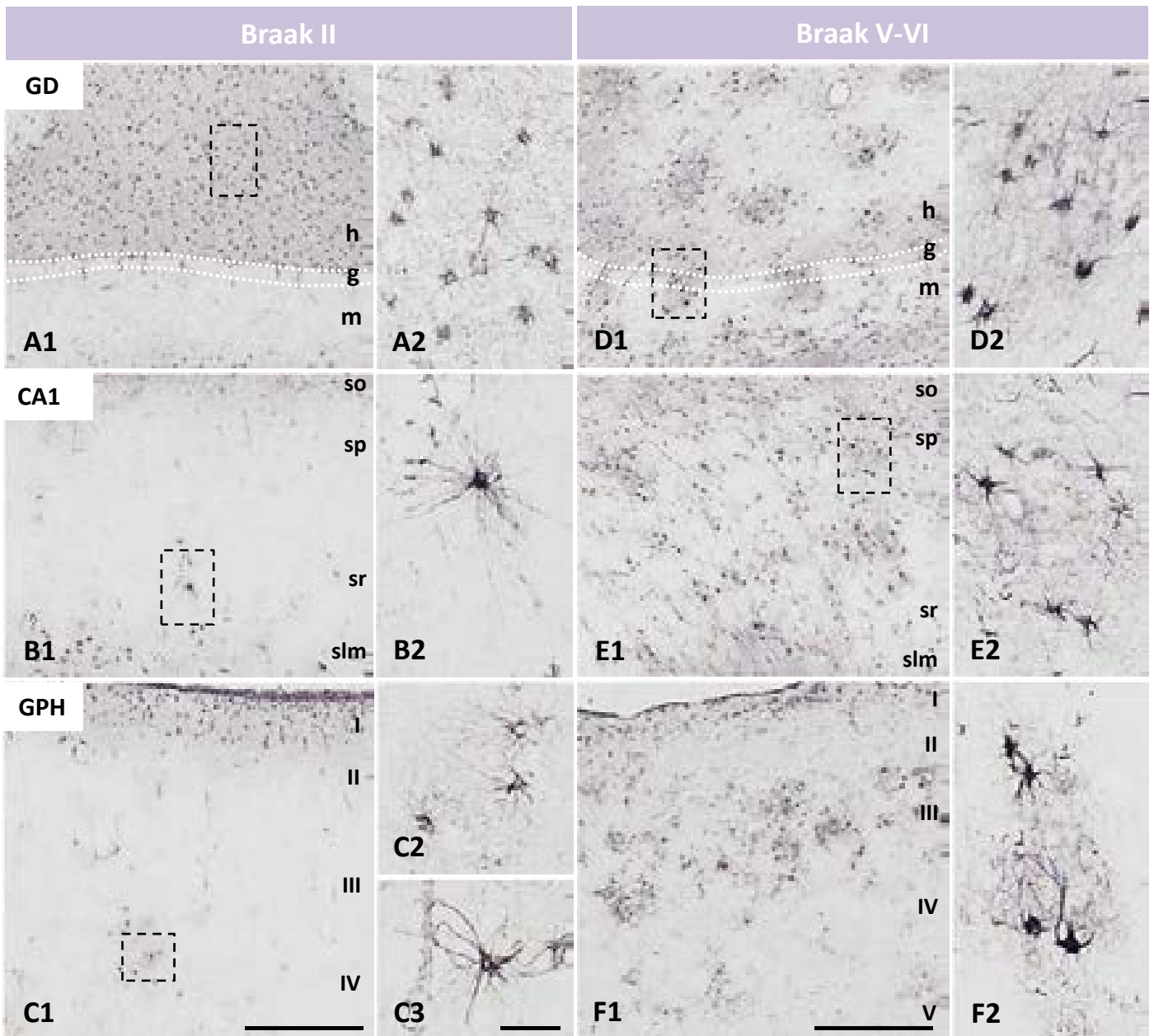
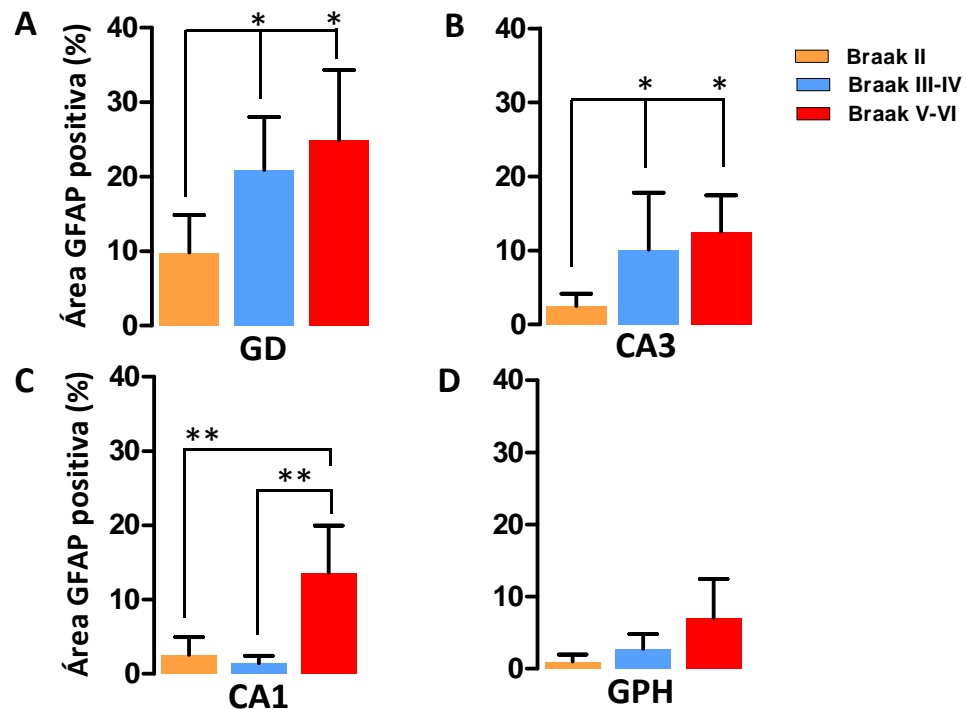


Figura 3.3.31. Patrón de distribución de la astrogliá GFAP-positiva en el GD (A y D), CA1 (B y E) y GPH (C y F) de casos dementes Braak V-VI y casos leves Braak II, respectivamente. El estudio inmunohistoquímico para GFAP muestra una gran densidad de células astrocitarias en el hilio del GD de las muestras humanas Braak II (A1) en comparación con la regiones CA1 (B1) y GPH (C1) de los mismos casos, en donde las células GFAP-positivas se concentran exclusivamente alrededor de los vasos (B2 y C3). En estadios avanzados Braak V-VI, los astrocitos del GD se vuelven más reactivos y cambian su distribución (homogénea en Braak II, ver detalle ampliado A2) y se organizan alrededor de los depósitos de β -amiloide (D1, detalle ampliado en D2). En las regiones CA1 y GPH de los enfermos de Alzheimer se produce un notable incremento en la inmunorreactividad para GFAP (E1 y F1, respectivamente), asociada también a las placas de β . Los detalles ampliados D2-F2 muestran el cambio fenotípico que se producen en los astrocitos reactivos asociados al β , con sobreexpresión de GFAP tanto en el cuerpo celular como en las prolongaciones. *m*: capa molecular; *g*: capa granular; *h*: capa polimórfica o hilio; *so*: stratum oriens; *sp*: stratum piramidale; *sr*: stratum radiatum; *slm*: stratum lacunosum-moleculare. Barra de escala: A1-F1: 500 μ m; A2-F2 y C3: 50 μ m.



N=4-6; ADEVA de una vía; Test de Tukey; * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

GD: $F(2, 11) = 4,56$; $P = 0,036$; CA3: $F(2, 12) = 4,10$; $P = 0,044$; CA1: $F(2, 12) = 13,45$; $P < 0,001$; GPH: No significativo

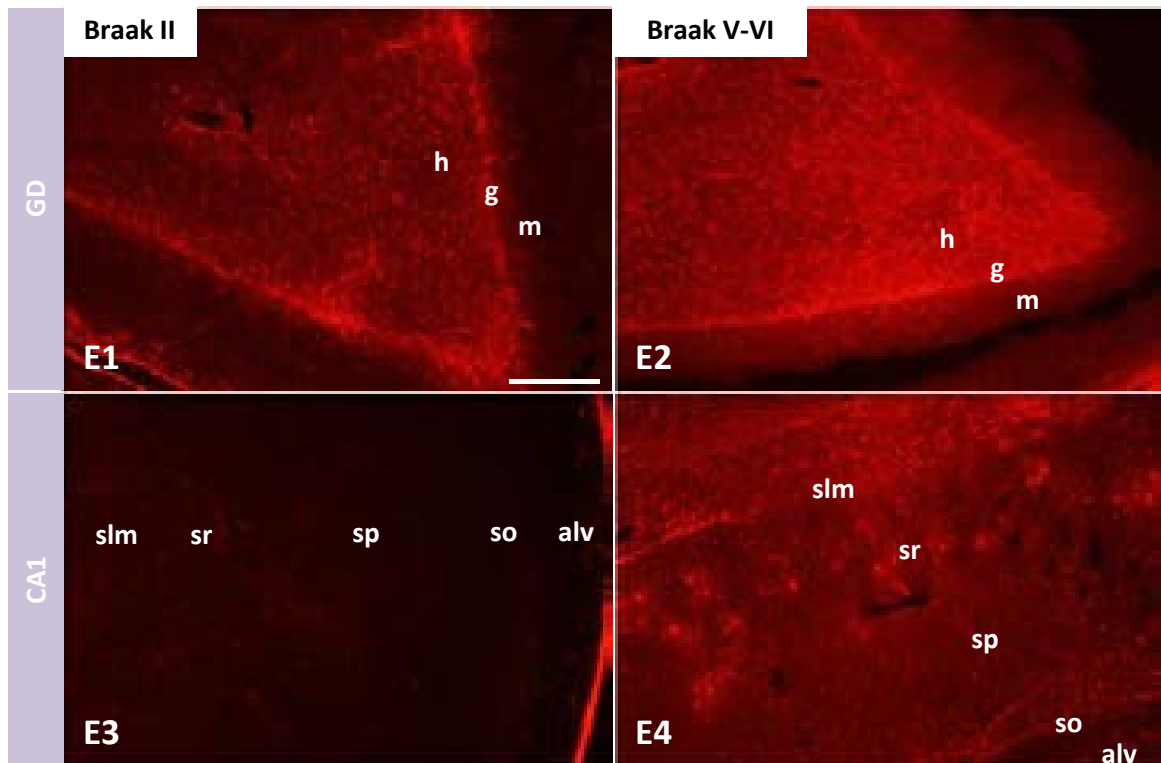


Figura 3.3.32. El hipocampo de los pacientes de Alzheimer desarrolla una respuesta astrogliar inflamatoria. El análisis cuantitativo del área ocupada por los astrocitos GFAP-positivos muestra un incremento significativo de la carga astrogliar en el GD (A), CA3 (B) y CA1 (C) del hipocampo de individuos de estadio avanzado Braak V-VI, en comparación con los casos de estadios leves. Además, el GD y CA3 de las muestras Braak III-IV también presentan cambios significativos. Debido a la variabilidad de la patología amiloide en el GPH, que se desarrolla desde estadios tempranos, no se producen cambios significativos en la carga inmunopositiva para GFAP (D). La serie de imágenes E1-E4, obtenidas mediante inmunofluorescencia simple para GFAP, muestra ejemplos representativos de los resultados obtenidos en el estudio cuantitativo. *m*: capa molecular; *g*: capa granular; *h*: capa polimórfica o hilio; *alv*: alveus; *so*: stratum oriens; *sp*: stratum piramidale; *sr*: stratum radiatum; *slm*: stratum lacunosum-moleculare. Barra de escala: 500 μm .

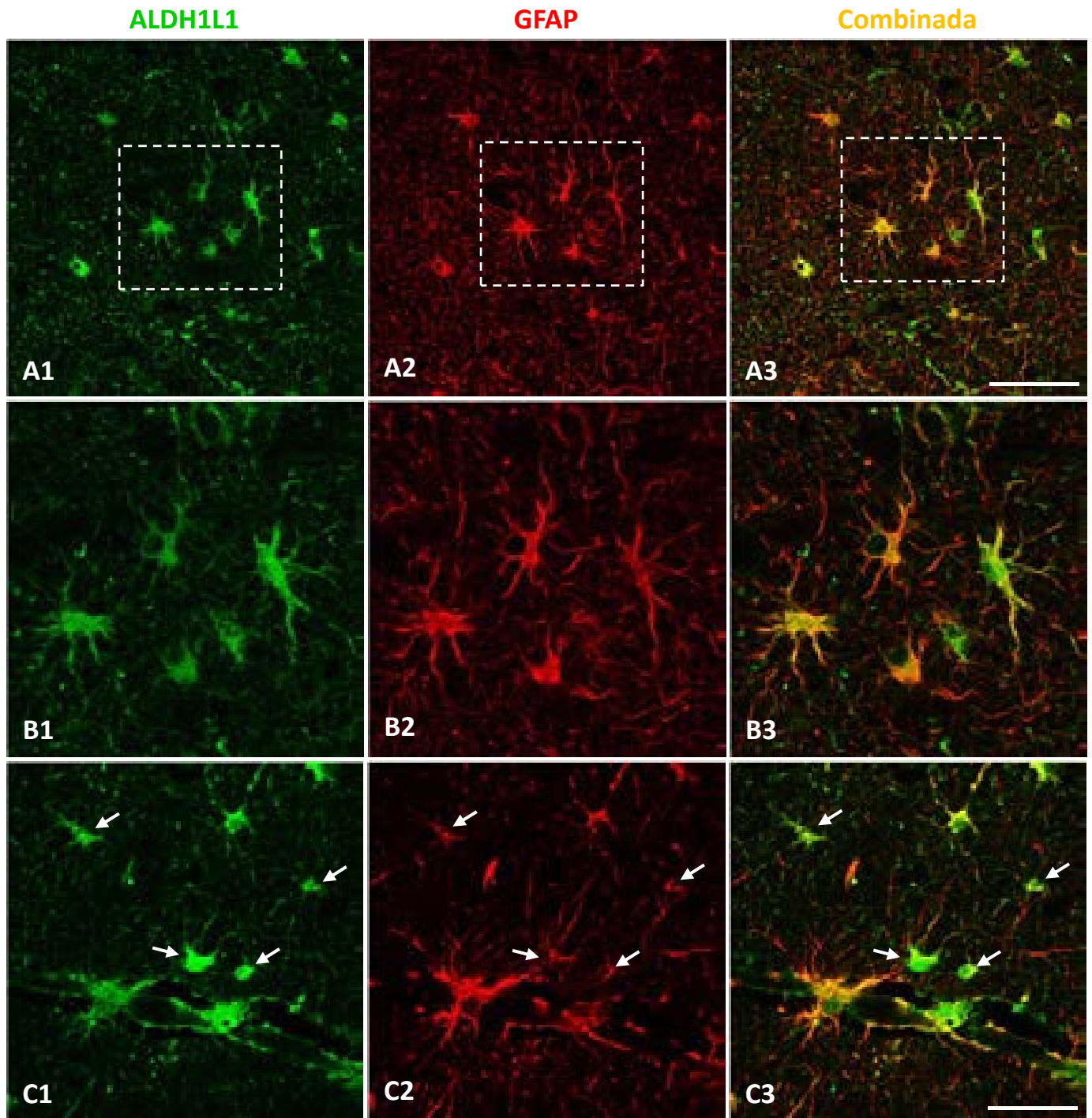


Figura 3.3.33. Estudio comparativo entre el clásico marcador de astroglia GFAP y el marcador constitutivo ALDH1L1. Inmunofluorescencia doble para microscopía láser confocal con ALDH1L1 (A1-C1) y GFAP (A2-C2) en el hipocampo y GPH de individuos de estadio leve Braak II-III. Como muestra la imagen combinada A3, ambos marcadores se detectan desde los estadios iniciales de la enfermedad (ver detalle ampliado en B3). El marcador constitutivo ALDH1L1 se expresa en todos los astrocitos con independencia de su fenotipo (flechas en C), sin embargo la astroglia reactiva exhibe una mayor inmunorreactividad para GFAP en comparación con su estado quiescente (ver en detalle en C2). Barra de escala: A1-A3: 25 μ m; B1-C3: 50 μ m.

Las agrupaciones de las células astrocitarias observadas en los pacientes de Alzheimer fueron analizadas en detalle mediante experimentos inmunohistoquímicos dobles y triples para microscopía convencional de campo claro y microscopía confocal, para β -amiloide total (4G8) y astrocitos reactivos (GFAP) (Fig. 3.3.34). Efectivamente y como cabría esperar, las células astrocitarias reactivas se asociaron estrechamente con las placas de $A\beta$ como se muestra en las imágenes A y B de la figura 3.3.34. Además, fueron los depósitos de $A\beta$ neuríticos (con distrofias positivas para AT8) los que provocaron una mayor reactividad en la población glial GFAP-positiva (Fig. 3.3.34 D y E). Como puede observarse en la imagen de inmunotinción simple para GFAP (Fig. 3.3.34 C), las placas de $A\beta$ quedaron totalmente rodeadas por las prolongaciones astrocitarias. Así pues, las lesiones producidas tanto por el β -amiloide, como por la acumulación de fosfo-tau (Fig. 3.3.34 F) fueron aparentemente “cicatrizadas” por los procesos astrogiales.

Tras constatar la extensa activación astrogial asociada a la patología amiloide que tuvo lugar en las muestras de los pacientes Braak V-VI, y teniendo en cuenta que junto a un aumento de los niveles de ARNm para GFAP también tuvo lugar en estos individuos un incremento de los niveles de $TNF\alpha$ (resultados obtenidos por RT-PCR en colaboración con el laboratorio del Dr. Vitorica) (Fig. 3.3.35 A), y que la microglía reactiva era inmunonegativa para esta citoquina pro-inflamatoria y potencialmente citotóxica (resultado no mostrado), analizamos mediante inmunohistoquímica la posibilidad de que la astrogía reactiva pudiese expresar $TNF\alpha$. Los resultados de la inmunotinción doble para campo claro (Fig. 3.3.35 B) y microscopía láser confocal (Fig. 3.3.35 C) revelaron que las células GFAP positivas del hipocampo y giro parahipocampal de los pacientes de Alzheimer eran positivas para el anticuerpo anti- $TNF\alpha$ (visualizado a modo de punteado inmunopositivo en el interior de las células astrocitarias, ver insertos en las figuras 3.3.35 B1 y C).

Estos resultados de reactividad astrogial fueron mimetizados por el modelo APP/PS1. Tras analizar el hipocampo de los ratones transgénicos a los 6 y 12 meses de edad, mediante doble inmunofluorescencia para GFAP y APP (Fig. 3.3.36), se determinó que el hipocampo de los animales APP/PS1 de 12 meses desarrollan una extensa respuesta astrocitaria. La inmunorreactividad para GFAP incrementó entre los 6 y 12 meses de manera general en todas las capas del hipocampo, aunque fue el giro dentado el que presentó un mayor inmunomarcaje.

Por tanto, al igual que lo observado en los enfermos de Alzheimer, el hipocampo del modelo transgénico APP/PS1 desarrolló una extensa respuesta astrocitaria con la progresión de la patología.

Para finalizar la caracterización de la respuesta inflamatoria asociada al $A\beta$, se analizó en conjunto, la interacción de la población microglial y astrogial con las placas, tanto en el modelo transgénico APP/PS1 como en las muestras humanas de los pacientes de Alzheimer (Fig. 3.3.37). Para ello, se realizó una inmunofluorescencia triple para microscopía láser confocal para astrocitos (GFAP), microglía (Iba1) y β -amiloide (4G8). Como puede apreciarse en la serie de imágenes A1-A4 de la figura 3.3.37, los depósitos fibrilares que se formaron en los ratones transgénicos fueron rodeados periféricamente por las prolongaciones de la microglía y de la astrogía reactiva (ver imagen

Resultados

combinada A4). Este tipo de interacción también se observó en las placas que se formaron en el giro dentado de las muestras humanas Braak V-VI (no mostrado).

Las placas de tipo clásico de las muestras humanas (ver serie de imágenes B1-B4 de la figura 3.3.37) se encontraron totalmente rodeadas por las prolongaciones astrocitarias, que penetraron el halo de A β difuso hasta contactar con el núcleo de amiloide fibrilar, dibujando la forma de la placa. Las células microgliales, sin embargo, parecían evitar la periferia difusa, rodeando el centro compacto del A β (ver imagen combinada B4). Por tanto, en los ratones APP/PS1 así como en el giro dentado de los pacientes de Alzheimer, los depósitos extracelulares fibrilares se encuentran envueltos por las ramificaciones de ambos tipos celulares gliales, que se sitúan al mismo nivel. Y por el contrario, en las placas de A β de tipo clásico de las muestras humanas, las células microgliales son capaces de infiltrarse en el interior, rodeando el *core* fibrilar, mientras que las prolongaciones de la astrogía envuelven la placa en una posición más externa.

Astroglía/A β

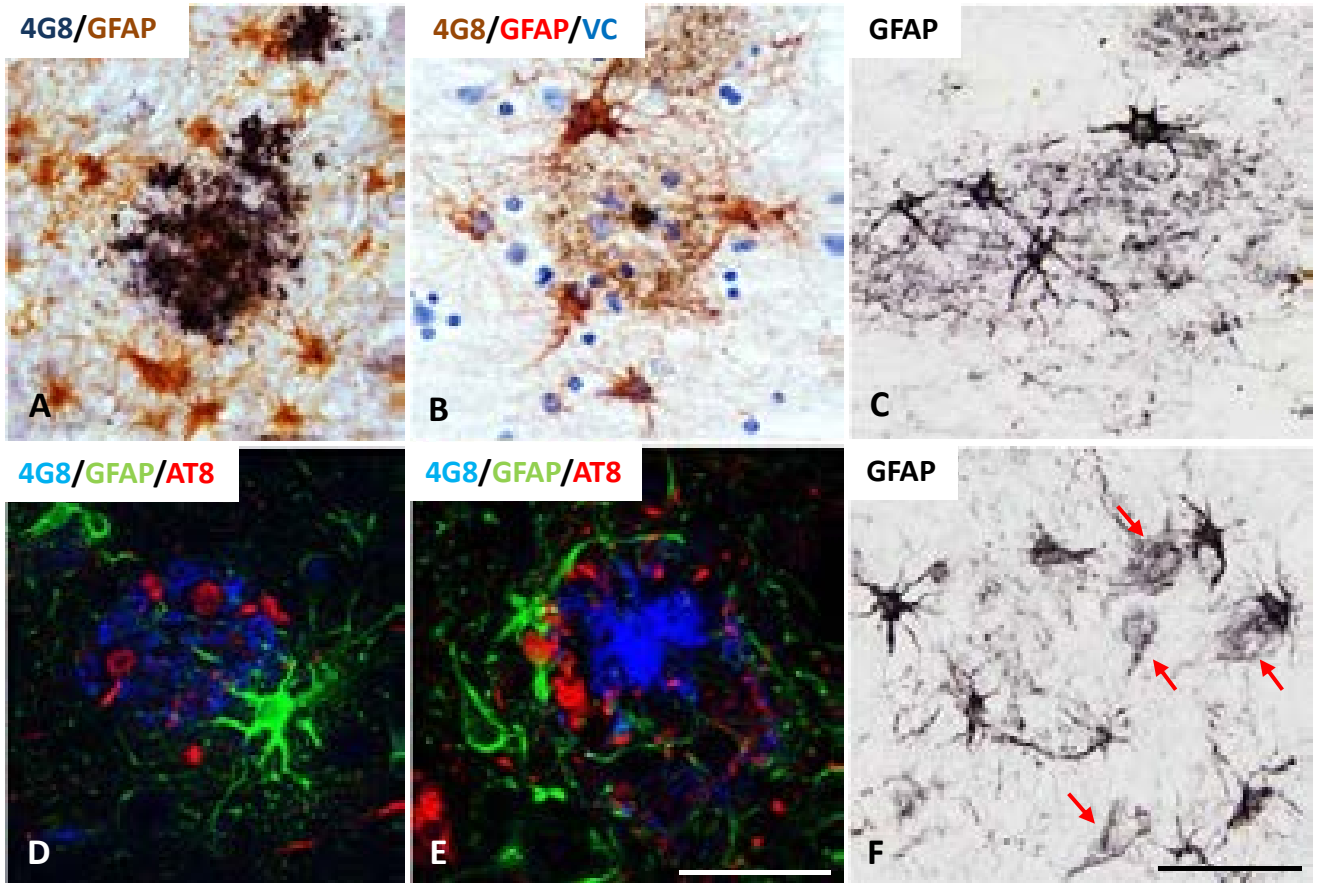


Figura 3.3.34. Relación de la astrogliá reactiva con las placas amiloides. Los astrocitos del hipocampo y GPH de las muestras humanas analizadas desarrollan una respuesta inflamatoria asociada al A β a lo largo de la patología. Las placas inmunoteñidas con el anticuerpo 4G8 (A, en azul oscuro; B, en marrón) se encuentran totalmente rodeadas por astrocitos reactivos (A, en marrón; B, en rojo). Las imágenes obtenidas mediante microscopía láser confocal muestran con detalle la asociación de células GFAP-positivas (en verde) con depósitos extracelulares neuríticos (D, y E; A β en azul, distrofias AT8-positivas en rojo). En las imágenes de inmunohistoquímica simple se aprecia como las prolongaciones astrocitarias cicatrizan las lesiones producidas por β -amiloide (C) y fosfo-tau (F, flechas rojas indican ovillos neurofibrilares o NFTs envueltos por procesos astrocitarios). Barra de escala: A-B-C-F: 50 μ m; D-E: 50 μ m.

Astroglía/TNF α

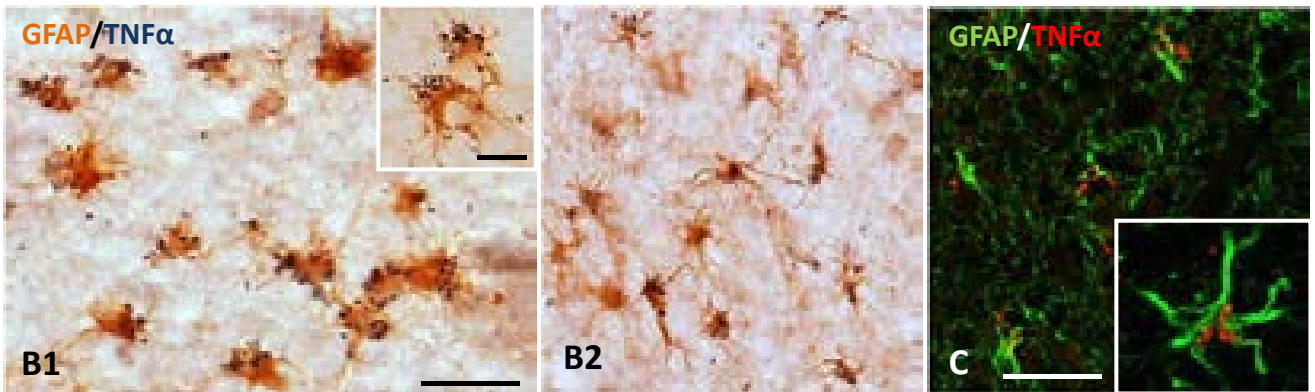
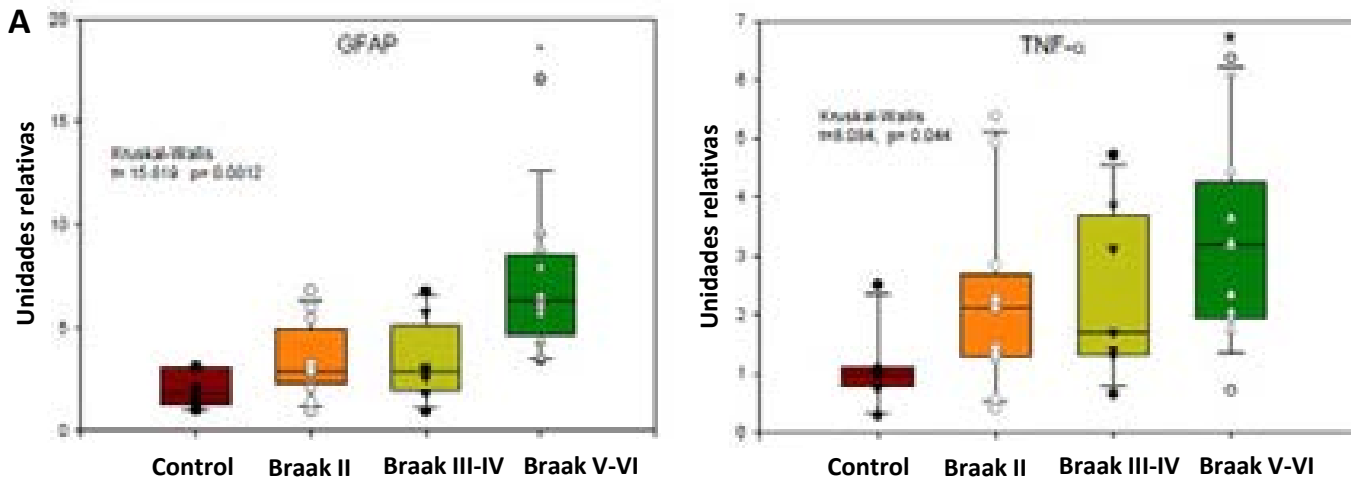
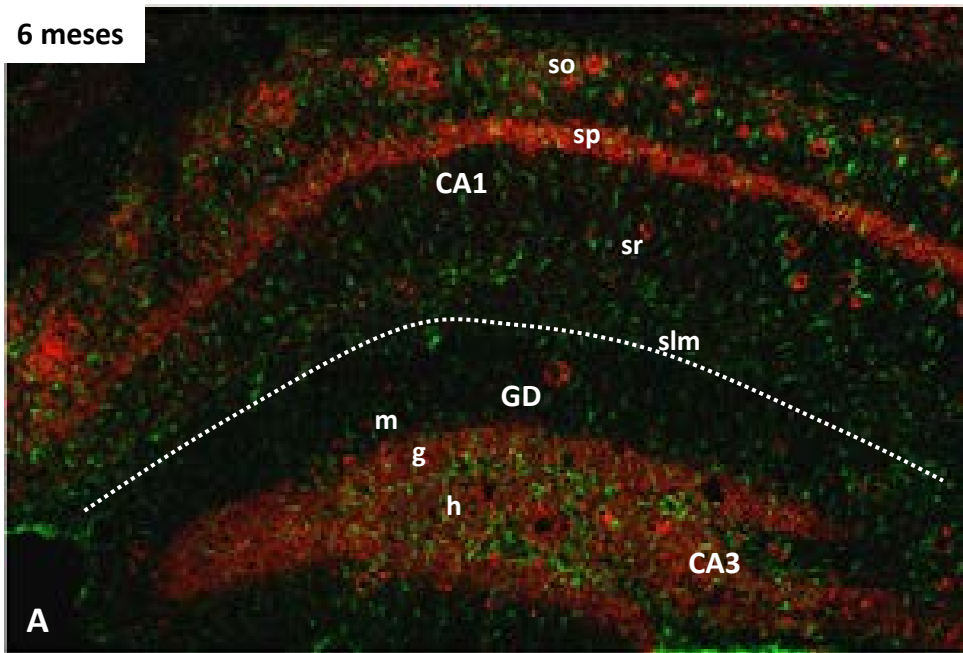


Figura 3.3.35. Los astrocitos del hipocampo y giro parahipocampal de los enfermos de Alzheimer producen TNF α .

A) El análisis cuantitativo de la expresión de ARNm mediante PCR corrobora los resultados inmunohistoquímicos obtenidos, indicando un incremento significativo de los niveles de ARNm de GFAP. Además, los niveles de expresión de la citoquina proinflamatoria TNF α también son mayores en los pacientes dementes (resultados obtenidos en colaboración con el Dr. Javier Vitorica de la Universidad de Sevilla). La inmunotinción doble para campo claro (B) y microscopía láser confocal (C) en muestras *post mortem* de individuos Braak V-VI revela marcaje intracelular de TNF α (B1-B2, en azul; C, en rojo) en las células GFAP-positivas (B1-B2, en marrón; C, en verde). Barra de escala: B1-B2: 20 μ m; inserto en B1 y C: 10 μ m; C: 25 μ m.

APP/PS1

6 meses



12 meses

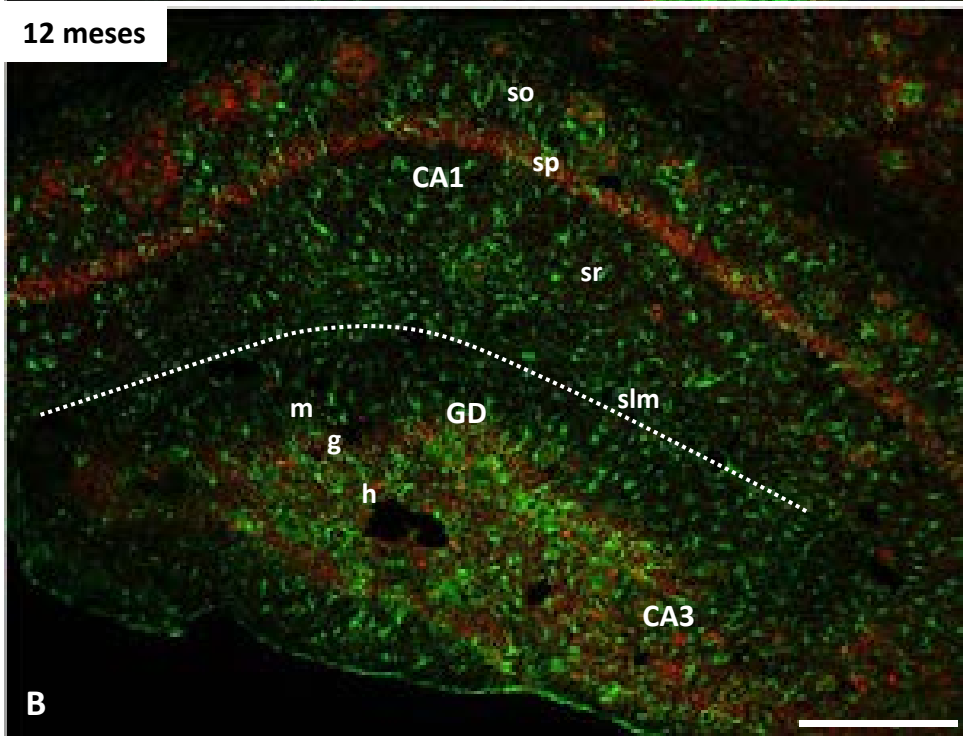


Figura 3.3.36. El hipocampo del modelo transgénico APP/PS1 desarrolla una extensa respuesta astrocitaria a lo largo del envejecimiento, al igual que ocurre en los enfermos de Alzheimer. Doble inmunofluorescencia para GFAP (verde) y APP (rojo) en el hipocampo de ratones APP/PS1 de 6 (A) y 12 meses de edad (B). La inmunoreactividad para GFAP aumenta entre los 6 y los 12 meses de edad de manera general en todas las capas del hipocampo, aunque es en el GD de los ratones APP/PS1 donde se produce un incremento más notable. *GD*: giro dentado; *CA*: asta de Amón; *m*: capa molecular; *g*: capa granular; *h*: capa polimórfica o hilio; *so*: stratum oriens; *sp*: stratum pyramidale; *sr*: stratum radiatum; *slm*: stratum lacunosum-moleculare. Barra de escala: 500 μ m.

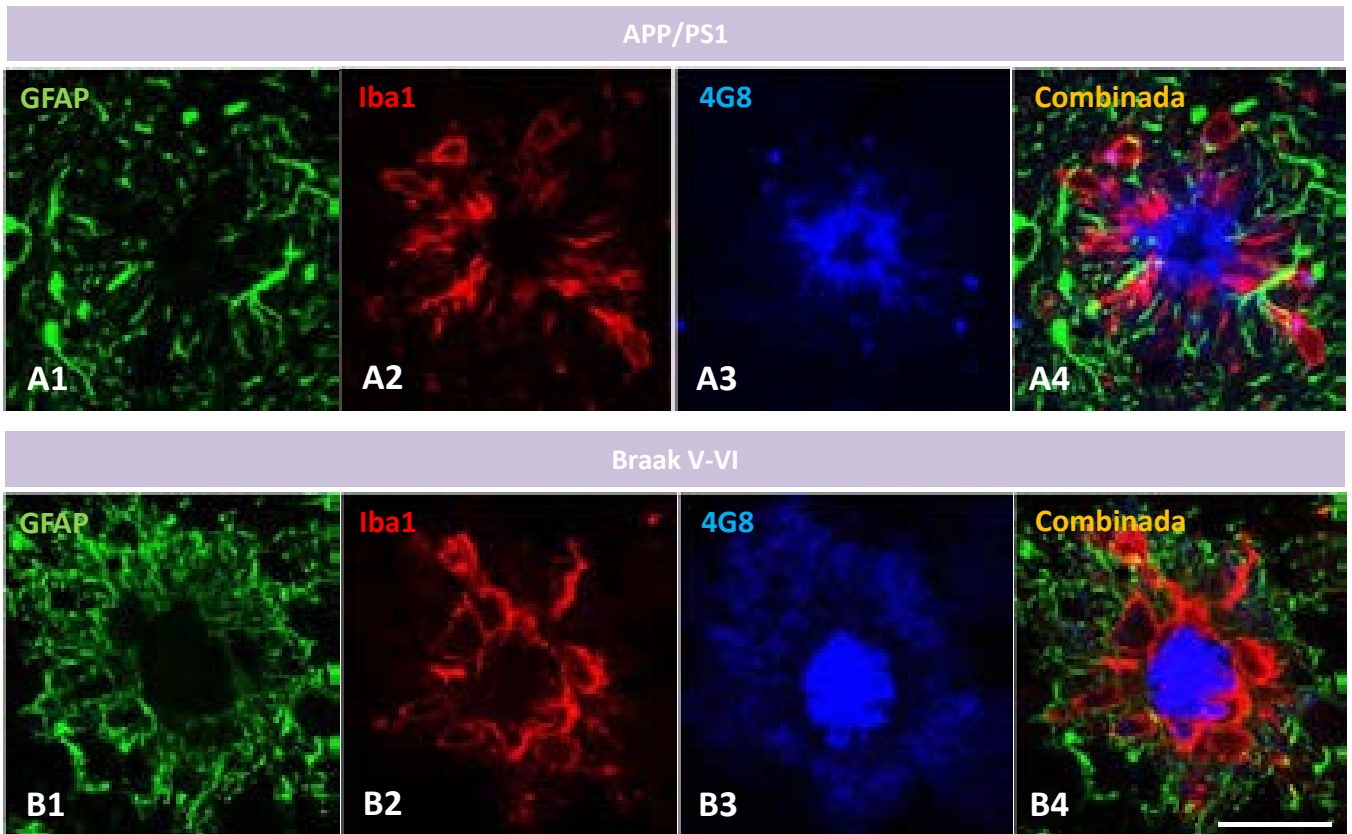


Figura 3.3.37. Interacción glía/placa de A β en el hipocampo del modelo transgénico APP/PS1 (A) y en los pacientes de Alzheimer (B). Inmunofluorescencia triple para microscopía láser confocal para astrocitos (GFAP, en verde), microglía (Iba1, en rojo) y β -amiloide (4G8, en azul). Los depósitos fibrilares que se forman en los animales APP/PS1 se encuentran rodeados periféricamente por las prolongaciones de ambos tipos de células gliales (ver imagen combinada A4). Las placas de tipo clásico que se desarrollan en las muestras humanas se encuentran totalmente selladas por los procesos astrocitarios (B1) que penetran en el halo de A β difuso hasta topar con el núcleo de amiloide fibrilar (B3); las células Iba1-positivas, sin embargo, abandonan la periferia difusa y rodean el centro compacto de la placa (B2) (ver imagen combinada en B4). Barra de escala: 50 μ m.

Capítulo 3.4.

NEURODEGENERACIÓN EN EL HIPOCAMPO Y GIRO PARAHIPOCAMPAL DE MUESTRAS HUMANAS Y DEL MODELO MURINO APP/PS1

3.4.1. Degeneración de interneuronas SOM y PV en el hipocampo y corteza perirrinal de los individuos dementes Braak V-VI

Las interneuronas juegan un papel crucial en controlar la actividad de las neuronas principales manteniendo el equilibrio funcional de los circuitos neuronales y previniendo la hiperexcitabilidad. Resultados previos de nuestro grupo de investigación realizados en el modelo transgénico APP_{751S}L/PS1_{M146L} han demostrado una pérdida significativa y selectiva de interneuronas que expresan los neuropéptidos somatostatina (SOM) y neuropéptido Y (NPY) en el hipocampo (disminución del 50-60%) y en la corteza entorrinal (disminución del 56% y 46%, respectivamente) de estos animales a los 6 meses de edad (Ramos et al. 2006; Moreno-Gonzalez et al. 2009). Es de destacar que en la región del subículo (localizada entre la región CA1 del hipocampo propio y el presubículo, y fundamental en la integración de información hipocampal y entorrinal) existe degeneración de esta población de interneuronas a partir de los 4 meses de edad, siendo la región que se ve más afectada por la muerte neuronal temprana, ya que incluso sufre pérdida de neuronas principales glutamatérgicas de forma temprana (Trujillo-Estrada et al. 2014)

En el presente trabajo, y con idea de validar los resultados obtenidos en modelos animales, hemos determinado mediante inmunohistoquímica y cuantificación estereológica, la densidad (células/mm³) de interneuronas SOM-positivas y PV-positivas en el hipocampo y corteza perirrinal de muestras humanas durante la progresión de la enfermedad (desde estadios Braak II a estadios Braak V-VI).

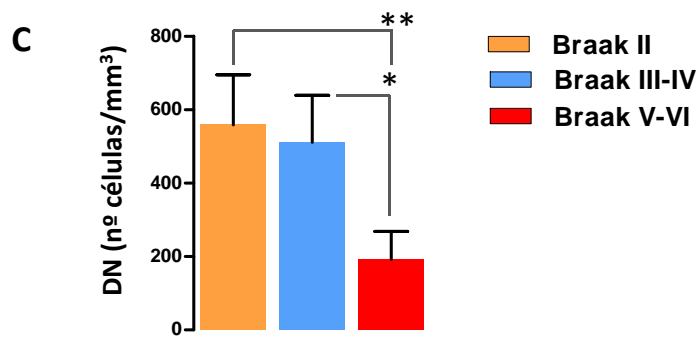
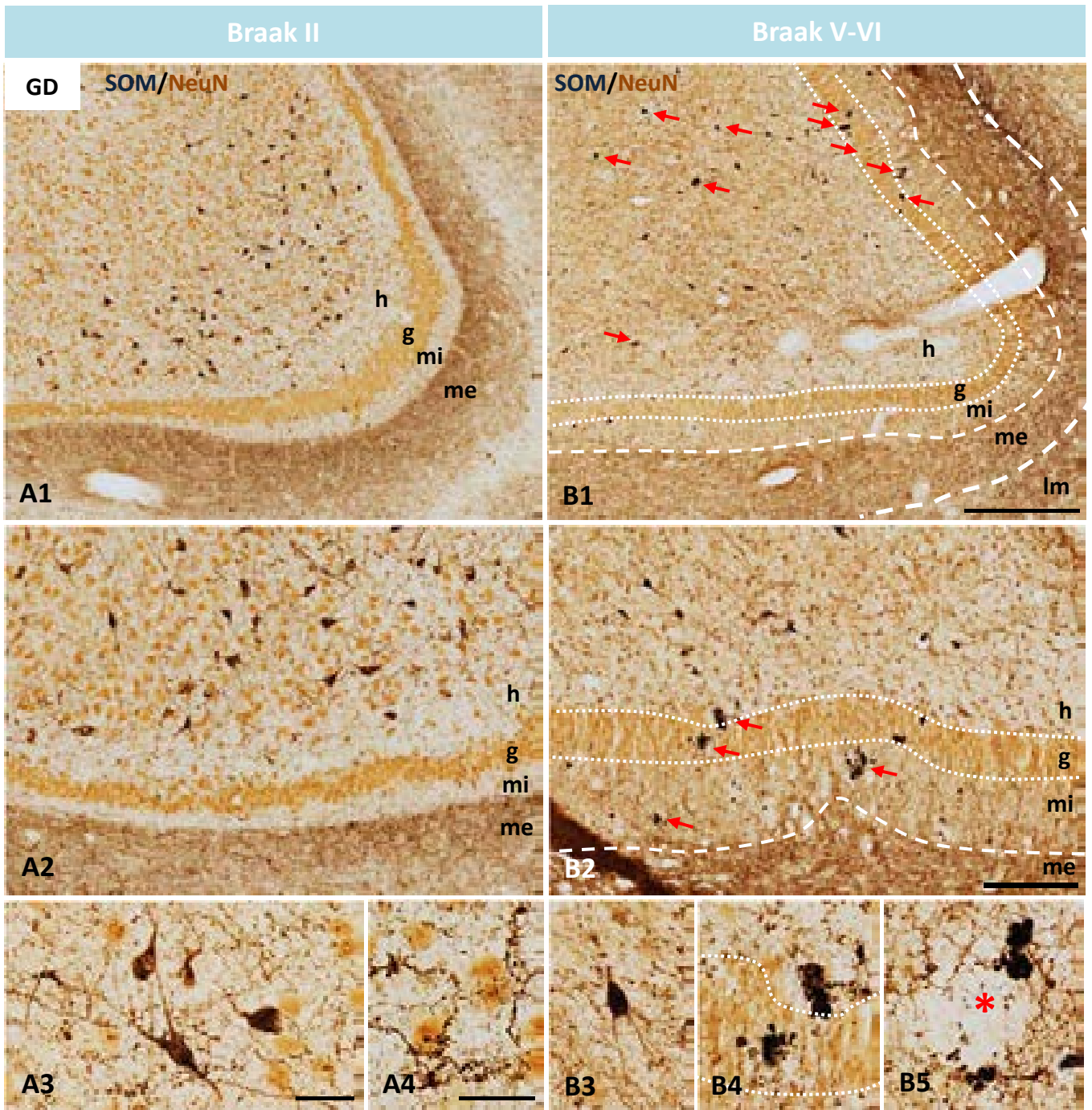
La inmunorreactividad para SOM en el giro dentado se ilustra en la figura 3.4.1 en secciones doblemente inmunoteñidas para SOM y el marcador de neuronas NeuN. En los individuos Braak II (Fig. 3.4.1 A1) y controles (no mostrados) las neuronas SOM-positivas se localizaron en la región del hilio del giro dentado y se corresponden con las células HIPP (del inglés *Hilar Interneurons with axons innervating the terminal zone of the Perforant Path*). A nivel morfológico se caracterizan por ser neuronas multipolares (Fig. 3.4.1 A2 y detalles en Fig. 3.4.1 A3). Se identificaron numerosas fibras inmunorreactivas SOM-positivas (detalle en Fig. 3.4.1 A4), siendo destacable el plexo SOM-positivo localizado en la capa molecular (ver Fig. 3.4.1 A1 y A2), campo terminal de estas neuronas inhibitorias sobre las dendritas distales de las células granulares. El patrón de distribución y la densidad de neuronas y fibras SOM-positivas fueron similares en los individuos Braak II y controles. En individuos dementes (Braak V-VI) la densidad de interneuronas hiliares SOM-positivas fue notablemente inferior a la observada en los casos Braak II y Braak III-IV (no mostrado) de edades

similares, tal y como se puede visualizar con la observación microscópica comparativa de las secciones (Fig. 3.4.1 B1 y detalle del hilio en B2). Las escasas neuronas SOM-positivas presentes mostraban una morfología multipolar típica (detalle en Fig. 3.4.1. B3, y era de destacar la presencia de numerosas distrofias inmunorreactivas (ver detalles en Fig. 3.4.1 B4 y B5). Estas distrofias se asociaban con regiones inmunonegativas, que representan posiblemente depósitos amiloides extracelulares (Fig. 3.4.1 B5).

El posterior estudio cuantitativo, mediante estereología utilizando las secciones inmunoteñidas, en la región del giro dentado mostró una disminución muy significativa de la densidad (células/mm³) de la población de interneuronas hiliares SOM-positivas en el grupo de individuos dementes (Braak V-VI) respecto a los que se encuentran en estadios anteriores Braak II (disminución del 66%) y Braak III-IV (disminución del 62%) sin demencia (Fig. 3.4.1 C).

En la región de CA1, las interneuronas SOM se localizan fundamentalmente en el estrato oriens (células O-LM) e inervan las dendritas distales de las células piramidales, localizándose el principal plexo inmunorreactivo en el estrato lacunoso-molecular. Este patrón de distribución se pudo apreciar en los individuos Braak II (Fig. 3.4.2 A1) y controles (no mostrado). Un detalle de las células O-LM con su morfología típica horizontal se muestra en la figura 3.4.2 A2. Además, se pudo detectar la presencia de células SOM-positivas biestratificadas (Fig. 3.4.2 A1, y detalle en A3) por todo el estrato piramidal, y que inervan las porciones proximales de las dendritas apicales y basales de estas neuronas. Un denso plexo de fibras positivas para SOM con aspecto varicoso se observó en individuos Braak II y V-VI (ver detalles en Fig. 3.4.2 A3 y B3). Al igual que ocurría en el giro dentado, en la región CA1 de los individuos Braak V-VI se apreció a nivel cualitativo una disminución muy evidente de la cantidad de cuerpos SOM-positivos (ver detalle de células O-LM en Fig. 3.4.2 B2) mientras que era destacable la presencia de abundantes neuritas distróficas inmunorreactivas (ver detalle en Fig. 3.4.2 B4). En esta región se decidió no realizar un estudio cuantitativo por estereología, ya que cualitativamente fue muy patente la reducción de neuronas SOM-positivas.

La siguiente región que analizamos fue la corteza perirrinal del giro parahipocampal. En esta región cortical, las neuronas SOM-positivas se localizaron en todas las capas siendo más abundantes en las capas profundas (IV-VI), como se muestra en la figura 3.4.3 A1 para el caso de los individuos Braak II (similar a los controles, no mostrados). La mayoría de las neuronas tenían un aspecto bipenachado, con dendritas primarias orientadas verticalmente u oblicuamente (Fig. 3.4.3 A1 y detalle en A2). Además, se apreciaron numerosas fibras inmunorreactivas para SOM (ver detalle en Fig. 3.4.3 A3); los axones de estas células tienen un recorrido ascendente hacia la capa I, donde se ramifican (no mostrado). El estudio comparativo con los individuos en fases avanzadas de la enfermedad, Braak V-VI, reveló una disminución de la cantidad de cuerpos SOM-inmunopositivos y la presencia de algunas, pero escasas, distrofias (Fig. 3.4.3 B1, y ver detalles en B2 y B3). La cuantificación estereológica (Fig. 3.4.3 C) de la densidad de cuerpos SOM-positivos determinó una reducción significativa en los individuos Braak III-IV (69%) y aún mayor en los Braak V-VI (91%).



N=3-6; ADEVA de una vía; $F(2, 10) = 11,982$; $P = 0,002$; Test de Bonferroni, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Figura 3.4.1 Reducción significativa de interneuronas SOM-positivas en el hipocampo de individuos dementes. Inmunohistoquímica doble para SOM (azul/marrón oscuro) y NeuN (naranja) en el giro dentado de individuos Braak II (A1-A4) y Braak V-VI (B1-B5). Las neuronas SOM-positivas de las muestras Braak V-VI se encuentran gravemente afectadas por la patología neurodegenerativa, desarrollando una gran cantidad de neuritas distróficas de gran tamaño (flechas en B1 y B2), generalmente asociadas a las placas (asterisco) (B3, B4 y B5). Las células SOM de los individuos Braak II de la misma edad no parecen sufrir cambios patológicos (A3). C) El análisis cuantitativo mediante estereología muestra una disminución significativa de la densidad numérica de esta población neuronal en el giro dentado de pacientes de Alzheimer, en comparación con pacientes en estadios leves y moderados de la patología tau. *GD: giro dentado; g: capa granular; h: hilio; lm: lacunoso-molecular; me: molecular externa; mi: molecular interna*. Barras de escala: A1 y B1: 500 μm ; A2 y B2: 200 μm ; A3, B3-B5 y A4: 50 μm .

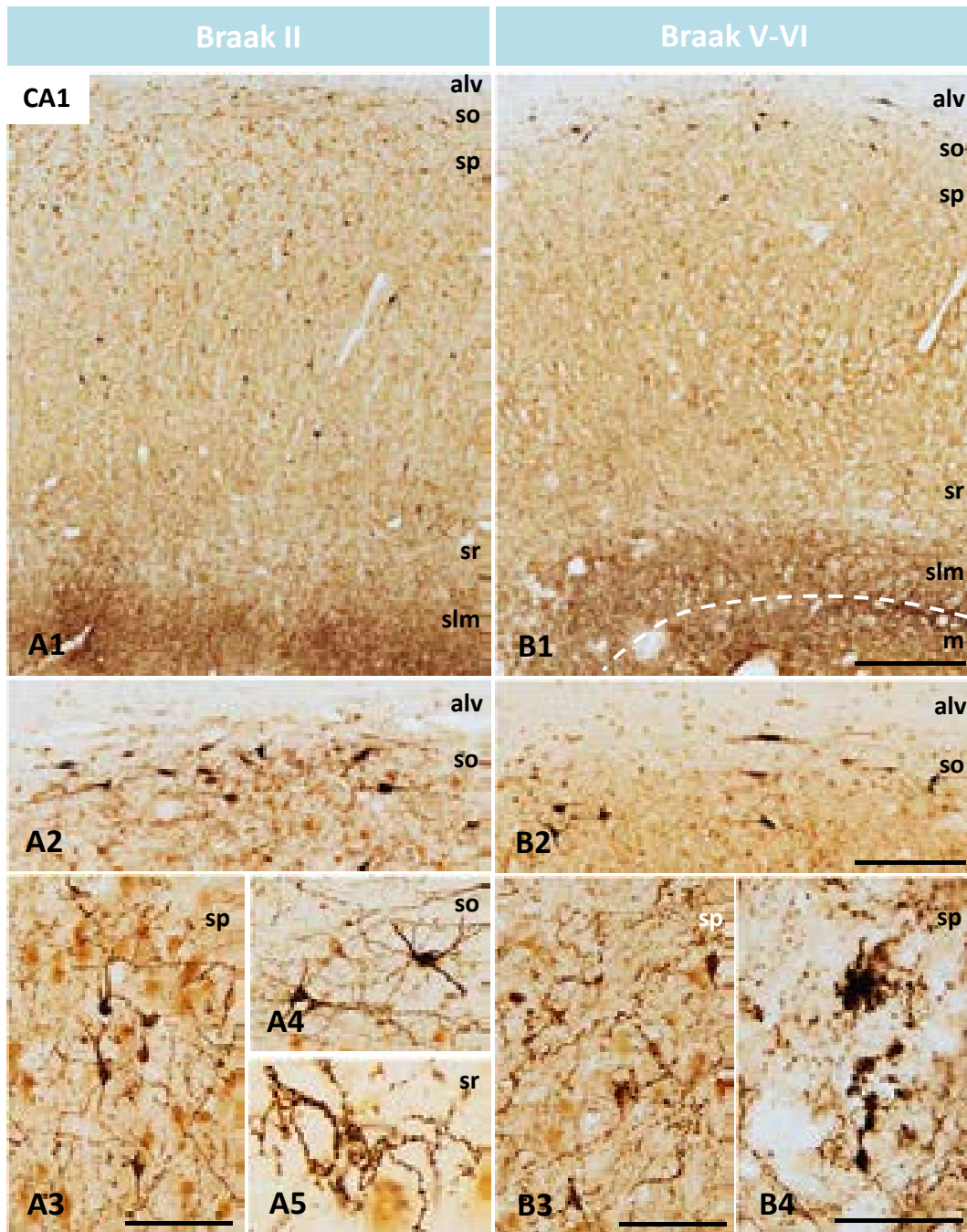


Figura 3.4.2. Disminución de la población de interneuronas SOM-positivas en la región CA1 del hipocampo de individuos dementes Braak V-VI. Inmunohistoquímica doble para para SOM (azul oscuro) y NeuN (naranja) en individuos Braak II (A1-A5) y Braak V-VI (B1-B4). El número de cuerpos neuronales que expresan SOM sufre una notable disminución en toda la región CA1 de las muestras Braak V-VI (B) en comparación con individuos Braak II de similar edad (A). La células O-LM del *stratum oriens* son las que parecen estar más afectadas (B2 vs A2). Se muestran detalles comparativos del marcaje en somas y neuropilo en Braak II (A3-A5) y Braak V-VI (B3, B4). Aunque de manera escasa, se observa también la presencia de neuritas distróficas positivas para SOM (B4). *alv*: alveus; *so*: *stratum oriens*; *sp*: *stratum pyramidale*; *sr*: *stratum radiatum*; *slm*: *stratum lacunosum-moleculare*. Barra de escala: A1 y B1: 500 μ m; A2 y B2: 200 μ m; A3, A4 y B3: 100 μ m; B4: 50 μ m; A5: 20 μ m.

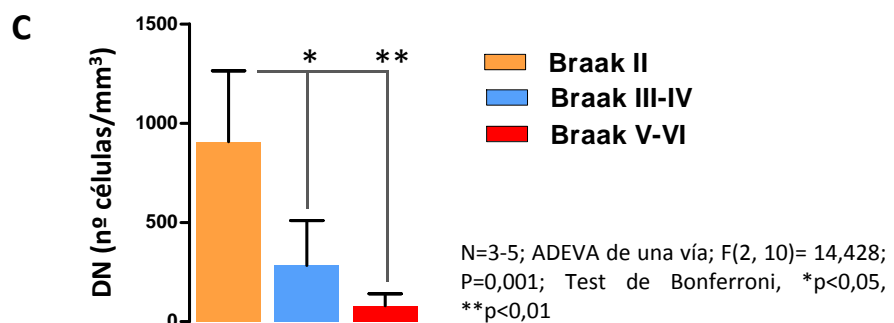
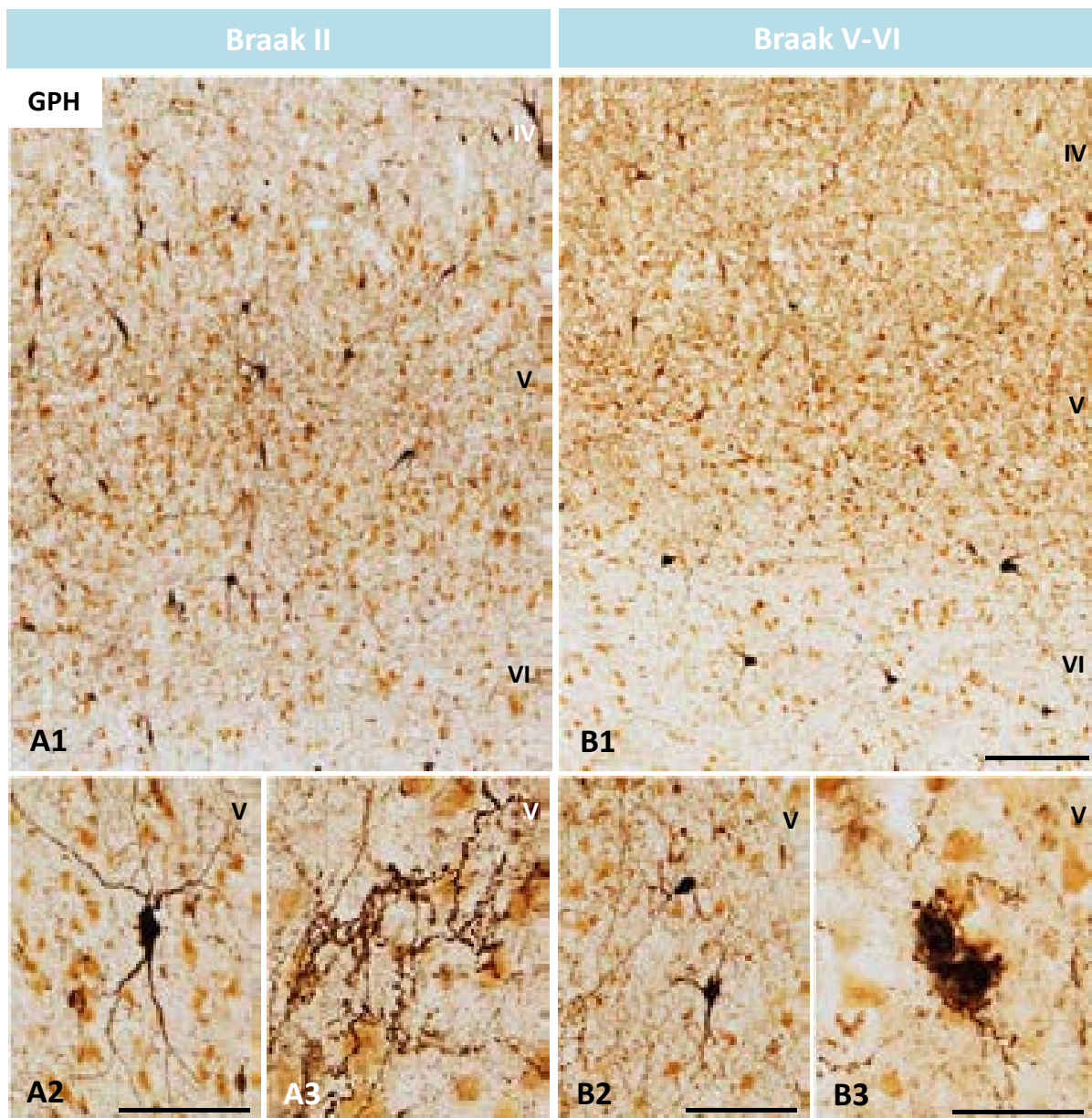


Figura 3.4.3. Disminución significativa de interneuronas SOM-positivas en la corteza perirrinal de individuos dementes. Inmunohistoquímica doble para SOM (azul oscuro) y NeuN (naranja) en la corteza perirrinal del giro parahipocampal de individuos Braak II (A1-A3) y Braak V-VI (B1-B3). La corteza perirrinal de los individuos Braak V-VI muestra una cantidad notablemente menor de interneuronas SOM (B1) en comparación con los sujetos Braak II de similar edad (A1). Detalle de neuronas (A2 y B2) y neuropilo (A3 y B3) SOM-positivos. En los casos Braak V-VI las neuritas distróficas son escasas (B3). C) Cuantificación estereológica de células SOM-positivas. El análisis cuantitativo muestra una disminución muy acusada de la densidad numérica de esta población neuronal en la corteza perirrinal del giro parahipocampal de las muestras Braak V-VI, y en menor medida en las de Braak III-IV, en comparación con individuos en estadios iniciales de la patología tau. Barra de escala: A1 y B1: 200 μm ; A2 y B2: 100 μm ; A3 y B3: 50 μm .

A continuación, analizamos la población de interneuronas que expresa la proteína ligadora de calcio parvalbúmina (PV). La mayoría de estas interneuronas participa en la inhibición perisomática (células en cesto) y de los segmentos iniciales de los axones (células en candelabro) de las células principales en hipocampo y corteza.

El giro dentado de individuos controles (no mostrado) y Braak II (Fig. 4.4.4) presenta escasas células PV-positivas y éstas se localizan principalmente en el hilio, distribuidas heterogéneamente (Fig. 3.4.4 A1) y en la zona adyacente a la capa granular (Fig. 3.4.4 A2), y forman un denso plexo inmunorreactivo perisomático en la capa granular (Fig. 3.4.4 A2). Las células tenían un aspecto multipolar o bipolar. Ocasionalmente se pudo detectar alguna célula inmunorreactiva dentro de las capas granular y molecular (Fig. 3.4.4 A1). En los individuos en fases avanzadas de la enfermedad (Braak V-VI) el número de cuerpos PV-positivos en el giro dentado se encontró marcadamente reducido en comparación con los individuos Braak II o controles. Además, se detectó una disminución notable del plexo inmunorreactivo en la capa granular (Fig. 3.4.4 B1 y detalle en B2). Las distrofias PV-positivas fueron muy escasas (ver inserto en Fig. 3.4.4 B2).

La región de CA1, tal y como se aprecia en los individuos Braak II (Fig. 3.4.5) o controles (no mostrado) presentaba un mayor número de células PV-positivas que el giro dentado, y la mayoría se localizaba cerca de la capa piramidal (Fig. 3.4.5 A2) y algunas en el estrato oriens (Fig. 3.4.5 A1). Se detectaron numerosas prolongaciones PV-positivas por todas las capas, siendo de mayor densidad en la capa piramidal, la cual atravesaban con una orientación radial (Fig. 3.4.5 A1, A2). Un detalle de axones inmunorreactivos se puede observar en la Fig. 3.4.5 A3. En comparación, los individuos dementes Braak V-VI presentaban una pérdida muy acusada de cuerpos PV-positivos (Fig. 3.4.5 B1), especialmente aquellos localizados próximos a la capa piramidal (Fig. 3.4.5 B2), junto con una ligera reducción de las fibras nerviosas inmunorreactivas (ver detalle en Fig. 3.4.5 B3). A nivel cuantitativo, el estudio estereológico reveló una disminución significativa de la densidad (neuronas/mm³) de células PV-positivas en la región CA1 de los individuos en fases severas de la enfermedad (Braak V-VI) (72%) en comparación con los individuos Braak II (Fig. 3.4.5 C). En los individuos en fases intermedias (Braak III-IV) se observó una tendencia a la bajada de neuronas PV-positivas, aunque no fue significativa probablemente debido a la variabilidad interindividual en este grupo.

Dentro del giro parahipocampal, se estudió la población PV en la corteza perirrinal. En esta región cortical, los cuerpos PV-inmunopositivos se distribuyeron a lo largo de las láminas corticales II-VI, como se ilustra en la Fig. 3.4.6 A1 para un individuo Braak II. Imágenes de detalle de las neuronas inmunopositivas se ilustran en la figura 3.4.6 A2 y A3. Un denso plexo PV-positivo se localizó en la capa IIIb. Datos similares se obtuvieron en los individuos controles no mostrados. Al igual que para el hipocampo, en esta región cortical se detectó una marcada disminución, incluso era difícil encontrar algún cuerpo inmunoteñido, del número de neuronas PV-positivas en los individuos Braak V-VI (Fig. 3.4.6 B1). Las pocas neuronas PV-positivas que se encontraron en esta región mostraban una escasa inmunorreactividad en las dendritas (Fig. 3.4.6 B2 y B4). La presencia de neuritas distróficas, aunque no muy común, se pudo observar en ocasiones (Fig. 3.4.6 B3). Se detectó una reducción del plexo inmunorreactivo de capa III en estos individuos (ver Fig. 3.4.6 B1 y detalle en B4). Además, el

recuento estereológico corroboró también en el giro parahipocampal una disminución significativa de interneuronas PV-positivas (69%) en las muestras Braak V-VI con respecto a los controles Braak II de la misma edad (Fig. 3.4.6 C).

En conjunto, estos resultados indican la existencia de una profunda afectación de las poblaciones de interneuronas que expresan SOM y de aquellas que expresan PV en el hipocampo y giro parahipocampal de individuos en fases avanzadas (Braak V-VI), diagnosticados todos con demencia. Estos datos han sido corroborados a nivel de expresión transcripcional de los marcadores SOM, NPY (neuropéptido que colocaliza con SOM) y PV en muestras humanas de hipocampo (Fig. suplementaria 3.8). Estos resultados (obtenidos en el laboratorio del Dr. Vitorica, Univ. Sevilla) muestran que para SOM y para NPY la bajada fue significativa en los individuos Braak V-VI, mientras que a pesar de existir gran heterogeneidad en las muestras analizadas, la expresión de PV disminuyó incluso antes, siendo significativamente menor en los individuos Braak III-IV similar a los individuos Braak V-VI.

Para conocer la vulnerabilidad de esta población a la patología tau, realizamos un estudio de inmunofluorescencia doble para el marcador de SOM o PV con el marcador Tau-46. En el caso de SOM/Tau (Fig. 3.4.7) pudimos apreciar que algunas distrofias (Fig. 3.4.7 B1-B3), pero no todas (Fig. 3.4.7 A1-A3), eran positivas a ambos marcadores, así como algunos cuerpos neuronales (Fig. 3.4.7 C1-C3). Por el contrario, para la población PV-positiva no encontramos colocalización con Tau-46 (Fig. 3.4.8). Estos resultados deben ser refrendados mediante doble marcajes de PV con AT8 o AT100 (específicos de fosfo-tau).

3.4.2. Diferente vulnerabilidad al proceso degenerativo de las poblaciones de interneuronas SOM y PV en la corteza perirrinal del modelo transgénico APP/PS1

Nuestro grupo de investigación ha descrito con anterioridad la pérdida selectiva de interneuronas GABAérgicas en el hipocampo propio (Ramos y col., 2006), la corteza entorrinal (Moreno-Gonzalez et al. 2009) y el subículo (Trujillo-Estrada et al. 2014) del modelo APP/PS1. Por ese motivo, en este estudio nos hemos centrado en la corteza perirrinal, un área aún sin estudiar y de gran importancia por sus conexiones recíprocas con la corteza entorrinal y por su papel en el flujo de información entre el lóbulo temporal medial y áreas neocorticales.

Para analizar la organización laminar/celular de la corteza perirrinal se empleó la tinción general de violeta de cresilo en secciones coronales de animales WT y PS1/APP de 6 meses de edad (Fig. 3.4.9 A1-A2 y A3-A4). Esta región cortical se divide en dos zonas adyacentes citoarquitectónicamente distintas que se denominan área 35 y área 36, situadas alrededor del *sulcus rhinal* en niveles intermedios telencefálicos (Burwell, 2001). Las áreas 35 y 36 corresponden a las cortezas perirrinal y ertorrinal, respectivamente, siguiendo la nomenclatura de Franklin y Paxinos (2007) en el atlas del cerebro del ratón.

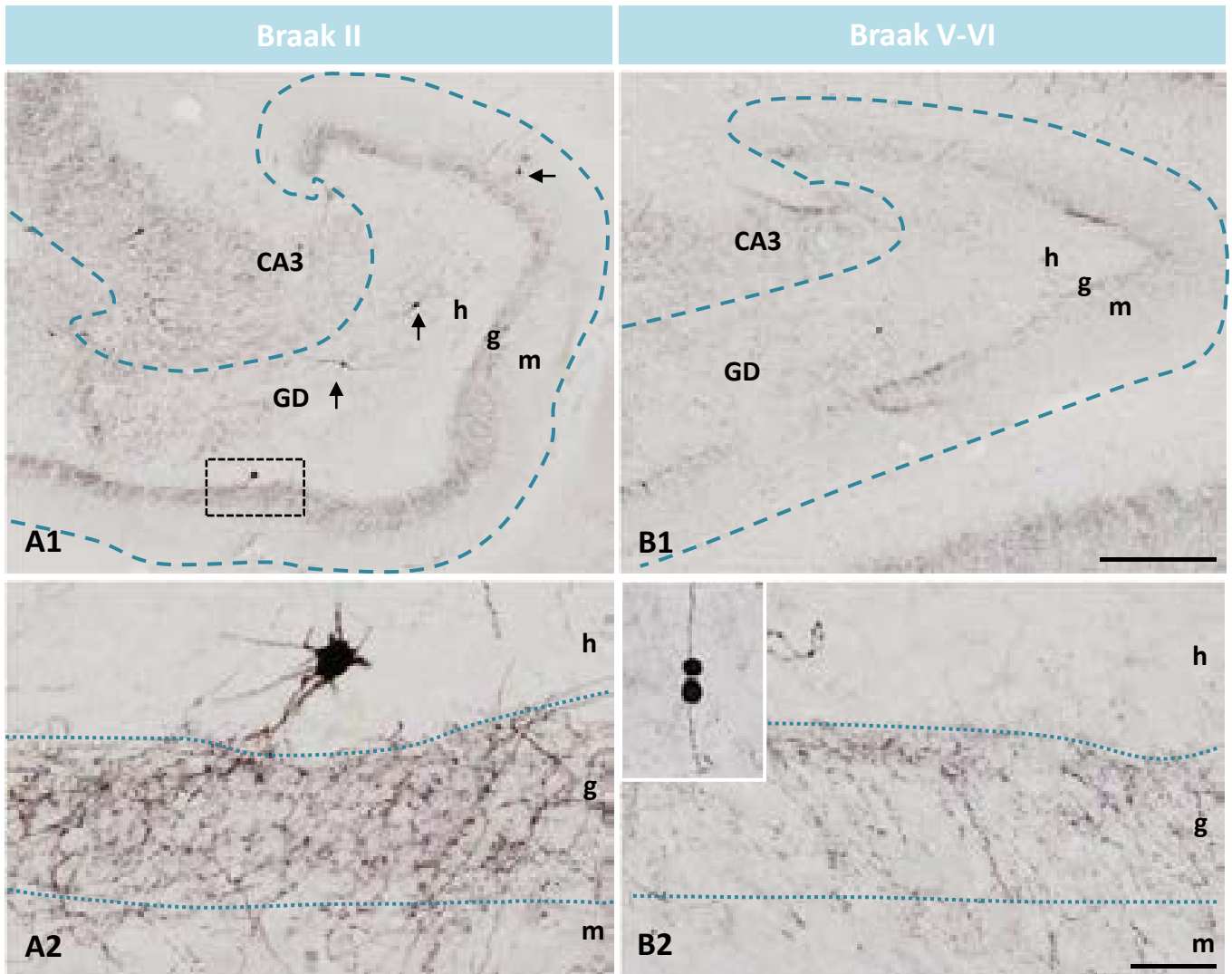


Figura 3.4.4. Inmunohistoquímica para PV en el giro dentado de individuos en estadio Braak II (A) y Braak V-VI (B). Se observa una disminución en la inmunoreactividad del marcaje de los plexos axonales PV-positivos que llegan a la capa granular del giro dentado de las muestras Braak V-VI (B1 y detalle en B2), en comparación con las muestras Braak II (A1 y detalle en A2). Además, se aprecia una menor densidad de somas inmunomarcadas en el hilio de los individuos dementes (B1 vs. A1, flechas indican somas). Las neuritas distróficas PV-positivas son escasas en todo el giro dentado (ver inserto en B2). CA: asta de Amón; GD: giro dentado; m: capa molecular; g: capa granular; h: capa polimórfica o hilio. Barra de escala: A1 y B1: 500 μ m; A2, B2 e inserto en B2: 50 μ m.

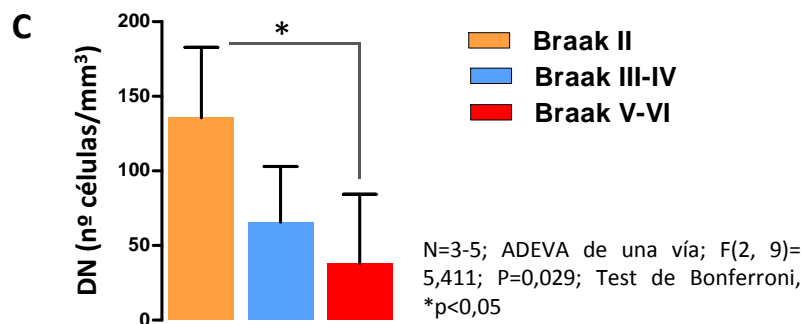
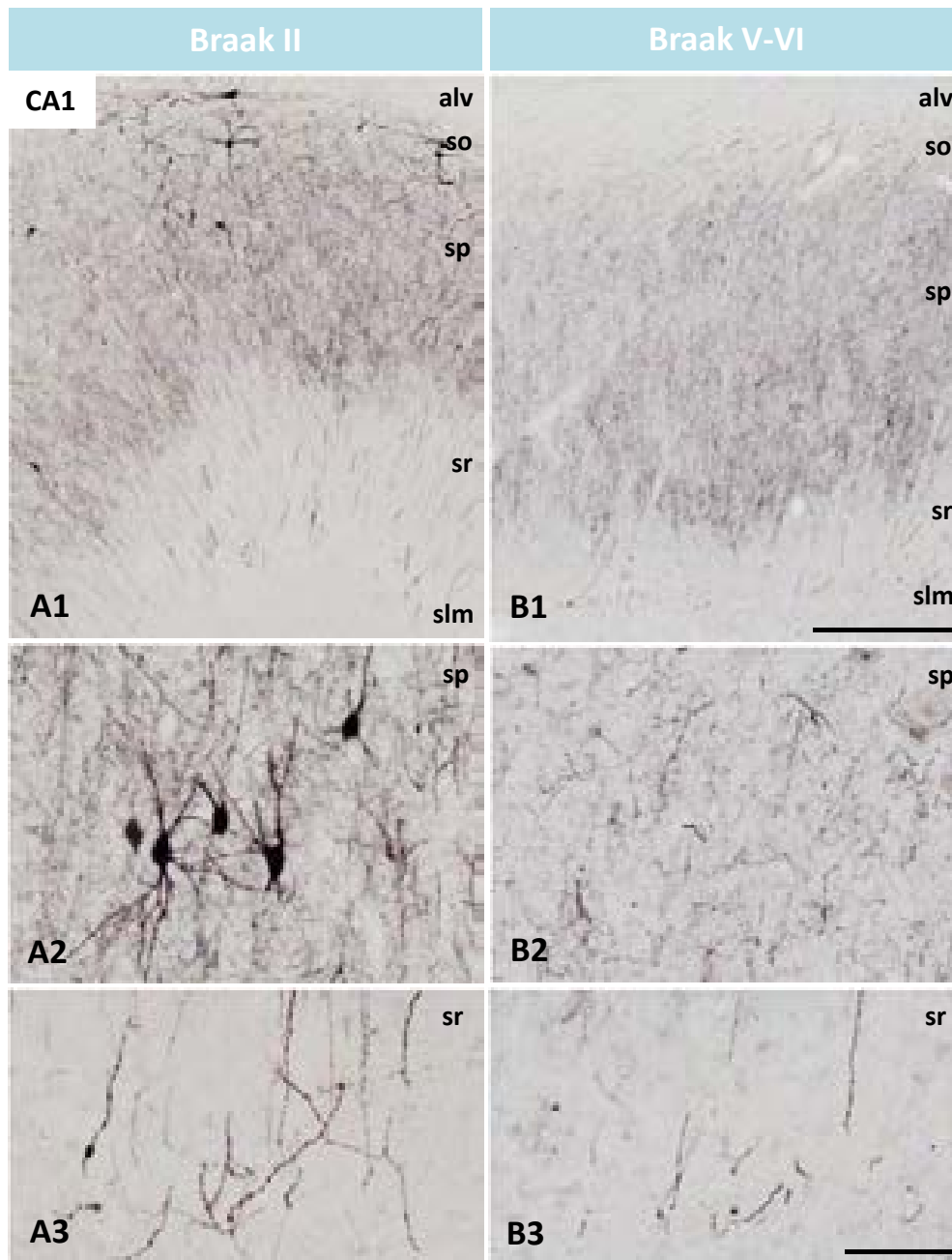


Figura 3.4.5. Reducción significativa de la población de interneuronas PV-positivas en el hipocampo de individuos dementes. Inmunohistoquímica para parvalbúmina (PV) en la región CA1 del hipocampo de individuos Braak II (A) y Braak V-VI (B). La cantidad de cuerpos neuronales PV-positivos y la densidad del plexo axonal inmunorreactivo es muy inferior en toda la región CA1 de las muestras Braak V-VI en comparación con las muestras Braak II de similar edad. C) El recuento estereológico demuestra la marcada disminución significativa de esta población GABAérgica en los individuos dementes (Braak V-VI). *alv*: *alveus*; *so*: *stratum oriens*; *sp*: *stratum pyramidale*; *sr*: *stratum radiatum*; *slm*: *stratum lacunosum-moleculare*. Barra de escala: A1 y B1: 500 μ m; A2-B3: 100 μ m.

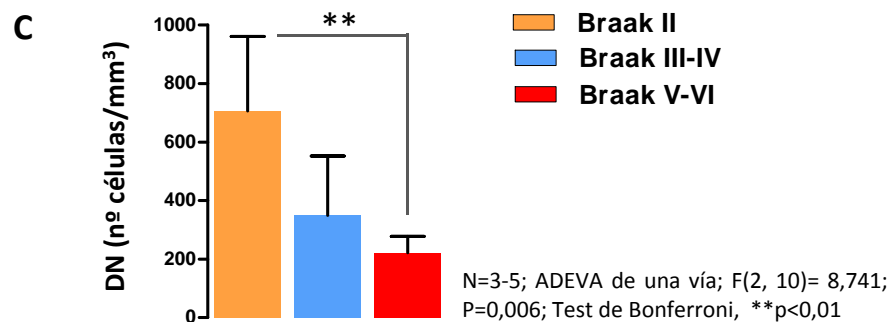
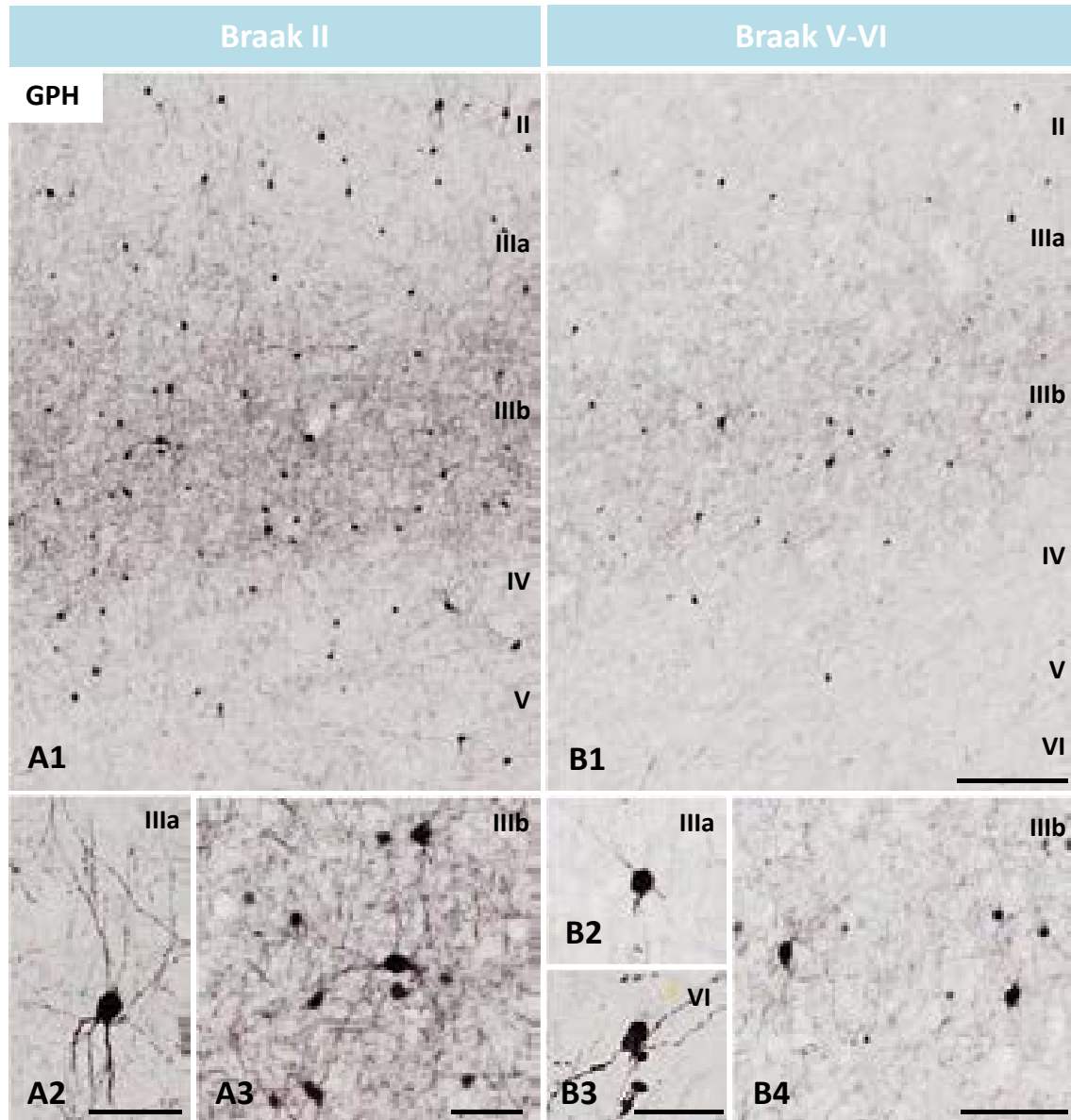


Figura 3.4.6. Reducción significativa de la población de interneuronas PV-positiva en la corteza perirrhinal del giro parahipocampal de individuos dementes. Inmunohistoquímica para parvalbúmina (PV) en individuos Braak II (A) y Braak V-VI (B). Las interneuronas que expresan PV en la capa IIIb de la corteza perirrhinal muestran una grave afectación en los pacientes Braak V-VI que afecta tanto al número neuronal como a la inmunorreactividad del neuropilo (B1). Además, esta población neuronal sufre degeneración dendrítica o pérdida de inmunorreactividad en estos procesos (B2), aunque forman escasas neuritas distróficas (B3). Detalles de neuronas inmunopositivas (A2 y A3). C) La cuantificación estereológica de la densidad de somas PV-positivos demuestra una reducción significativa en los individuos Braak V-VI respecto a individuos en estadios iniciales de la patología tau. Barra de escala: A1 y B1: 200 μm ; A2, B2 y A3: 50 μm ; B3: 25 μm ; B4: 100 μm .

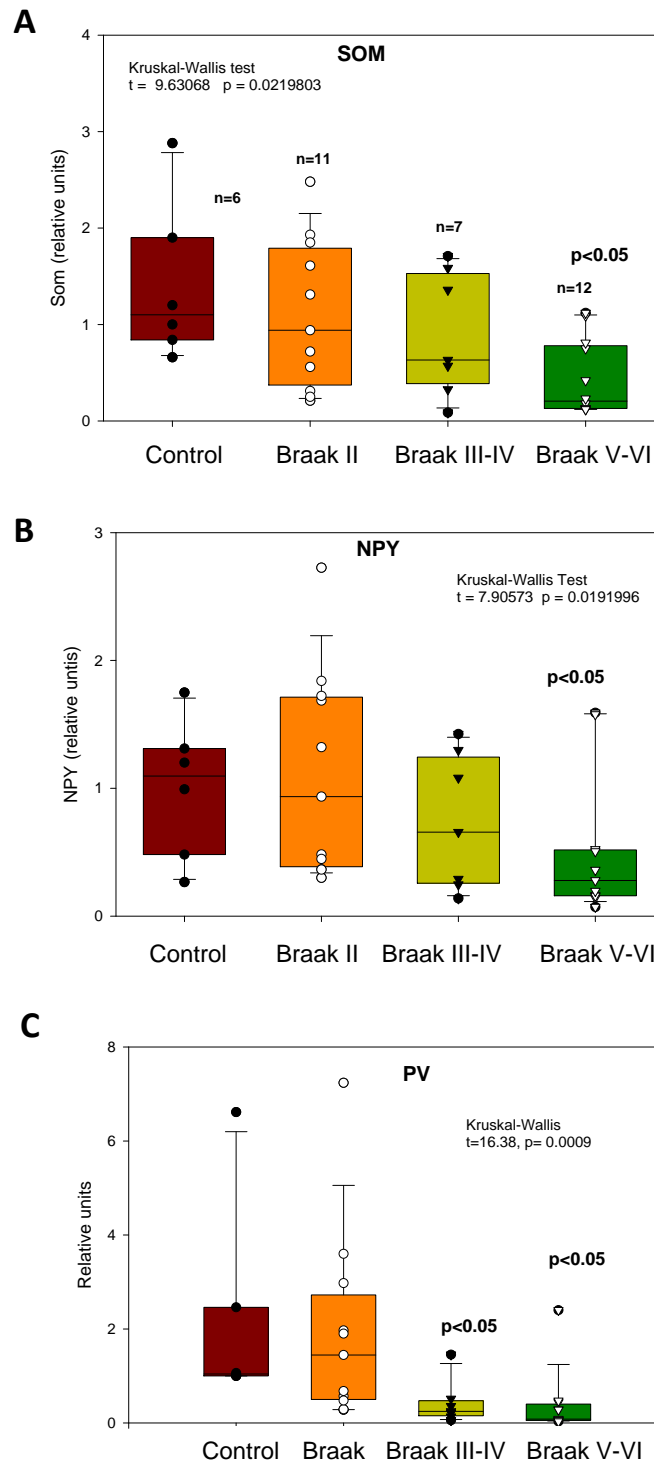


Figura Suplementaria 3.8. Expresión de ARNm de los marcadores neuronales SOM, NPY y PV en el hipocampo de muestras humanas control y Braak II, III-IV y V-VI. Existe una disminución significativa para SOM (A) y para NPY (B) en los individuos Braak V-VI, mientras que la bajada de PV (C) es muy marcada desde los estadios Braak III-IV. La expresión de estos marcadores indica una disminución en la población de interneuronas en el hipocampo de pacientes en fases avanzadas. Resultados obtenidos en colaboración con el Dr. Javier Vitorica de la Universidad de Sevilla.

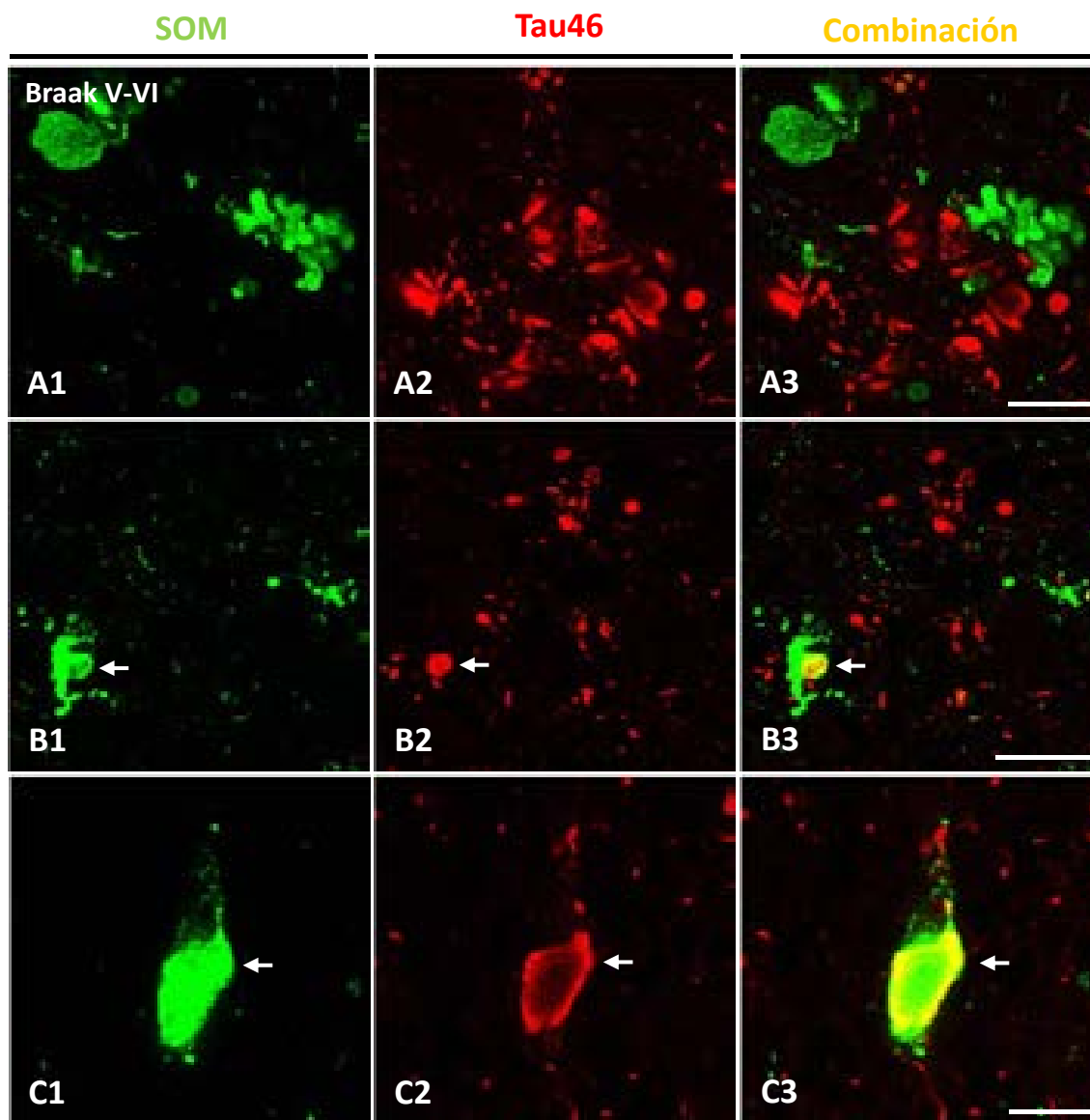


Figura 3.4.7. Limitada patología tau en las interneuronas SOM-positivas. Inmunofluorescencia doble para SOM (A1-C1) y Tau 46 (B2-C2) en el hipocampo de pacientes dementes Braak V-VI. En las imágenes combinadas de microscopía láser confocal (A3-C3) se observa que la mayor parte de las neuritas distróficas SOM-positivas no acumulan tau (A3), aunque en algunos casos se han visualizado algunas distrofias positivas para ambos marcadores (B3), e incluso algunas interneuronas SOM desarrollan también cambios neurofibrilares en el soma (C3). Barra de escala: A1-A3: 10 μ m; B1-B3: 50 μ m; C1-C3: 10 μ m.

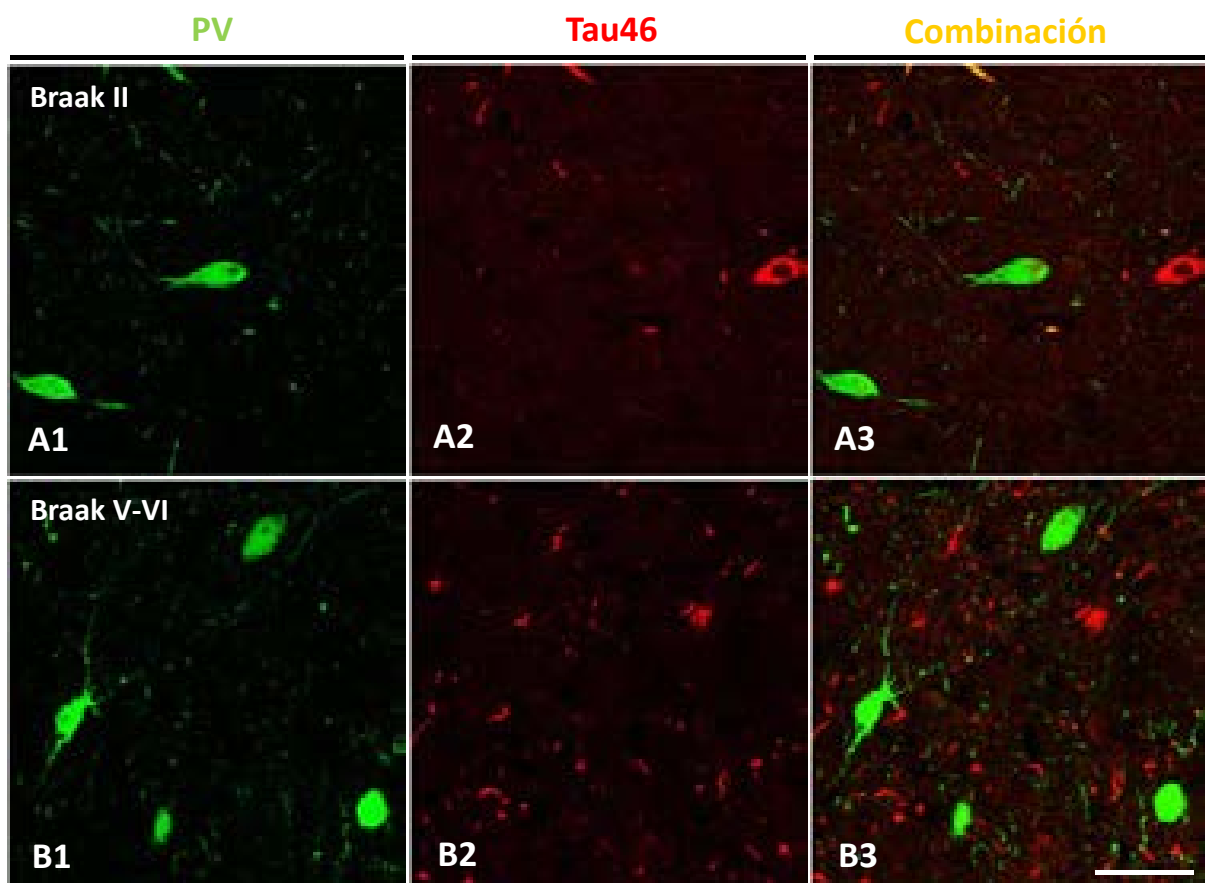


Figura 3.4.8. Ausencia de patología tau en la población de interneuronas PV-positivas. Inmunofluorescencia doble para PV y Tau 46 en el giro parahipocampal de individuos Braak II y V-VI. En las imágenes de microscopía láser confocal se observa que las interneuronas GABAérgicas que expresan PV (A1 y B1) expresan Tau46 (A2 y B2). Por lo tanto las interneuronas parvalbúmina no desarrollan cambios neurofibrilares asociados a tau a lo largo de toda la patología. Barra de escala: 20 μ m.

Ambas regiones de la corteza perirrinal (áreas 35 y 36) presentan seis capas o láminas (I-VI), siendo las capas I y IV plexiformes (con escaso número de neuronas) y las capas II, III, V y VI celulares (con gran densidad neuronal). No se apreciaron diferencias en el patrón laminar ni en el grosor aparente de las capas entre los dos genotipos, aunque sí que se observó una disminución de la densidad neuronal en las capas profundas a partir de los 6 meses de edad en el área 35, y más evidente a partir de los 12 meses en el área 36, en los ratones transgénicos respecto a los animales control WT de la misma edad (no mostrado). Además, a partir de los 6 meses, aparecieron en las capas profundas del área 35 de los ratones transgénicos estructuras redondeadas ligeramente teñidas de color rosáceo, correspondientes a las depósitos extracelulares del péptido A β .

El límite entre las áreas 35 y 36 se diferenció claramente utilizando la inmunotinción con 6E10 (Fig. 3.4.9 B1 y B2), que marca específicamente péptidos A β , así como formas precursoras ampliamente expresadas por las neuronas corticales piramidales en los ratones transgénicos. A edades tempranas (2-4 meses), cuando ninguna o muy baja cantidad de placas amiloides estaba presente y la mayor parte de la tinción de 6E10 se concentraba en los somas piramidales, el límite entre la zona 35 y 36 se observaba claramente. La principal diferencia entre las dos áreas fue la tinción de las capas superficiales II-III. Estas dos capas estaban fuertemente inmunoteñidas en el área 35 mientras que la marca fue muy débil en el área 36. Además, las neuronas de capas profundas V y VI del área 36 mostraban una fuerte inmunotinción, sin embargo, en el área 35 la inmunorreacción se concentró principalmente en las neuronas de capa VI, con pocas neuronas de capa V positivas para este anticuerpo (ver Figura 3.4.9 B2). Estos diferentes patrones de inmunotinción con 6E10 en las áreas 35 y 36 del cerebro del modelo APP/PS1 permite una mejor delimitación anatómica de ambas regiones.

El siguiente paso fue analizar la población de interneuronas SOM-positivas utilizando técnicas inmunohistoquímicas en animales APP/PS1 de 4, 6 y 12 meses en comparación con animales WT de la misma edad (Fig. 3.4.10). Esta población de interneuronas se localizó entre las capas II-VI de la corteza perirrinal en ambos genotipos, aunque la mayoría de ellas presentó una distribución preferente por las capas profundas en ambas regiones de la corteza, de forma más patente en el área 35. La capa I, generalmente, no contenía interneuronas somatostatina, aunque ocasionalmente se pudo observar algún soma inmunorreactivo en el límite con la capa II. En esta población de interneuronas se distinguieron dos grupos a nivel morfológico, un grupo perteneciente a células de aspecto multipolar, las de mayor tamaño, con varias dendritas primarias inmunoteñidas, y otro grupo formado por neuronas con soma ovalado o esférico, con escasas dendritas primarias inmunomarcadas (Fig. 3.4.10 A4).

En cuanto a la inmunorreactividad del neuropilo, se encontraron diferencias entre ambas regiones de la corteza perirrinal, presentando una tinción más marcada el neuropilo del área 36, donde se marcaron intensamente los plexos axonales de todas las capas, excepto los de las capas II-III.

Resultados

A los 4 y 6 meses de edad, no se apreciaron diferencias en cuanto a la distribución, morfología y cantidad de interneuronas SOM-positivas entre los dos genotipos analizados (Fig. 3.4.10 A1 para WT y A2-A3 para APP/PS1). A los 6 meses de edad, se observó la presencia de neuritas distróficas inmunopositivas para SOM, principalmente en las capas profundas de ambas regiones de la corteza perirrinal de los animales APP/PS1, asociadas a los depósitos de A β , no inmunomarcados (ver Fig. 3.4.10 A6). Aplicando la tinción con rojo Congo para marcar las placas fibrilares, se pudo comprobar la estrecha asociación de estas distrofias positivas para SOM con las placas amiloides (Fig. 3.4.10 B). Además, a partir de esta edad se apreció en los animales APP/PS1 una disminución del número de interneuronas positivas para SOM en las capas profundas, sobre todo del área 35, y de la intensidad de marcaje del neuropilo con respecto a los animales WT de la misma edad. A los 12 meses de edad, estas diferencias entre ambos genotipos se acentuaron (resultados no mostrados).

Para ver si el proceso neurodegenerativo que ocurre en esta subpoblación neuronal era debido a la acumulación intracelular temprana de péptido amiloide, se realizó un doble marcaje inmunohistoquímico de fluorescencia con los anticuerpos hAPP y SOM en la corteza perirrinal de animales APP/PS1 de 2 meses de edad (Fig. 3.4.10 C1-C3). Las imágenes a microscopía confocal mostraron que las interneuronas SOM-positivas no expresaban el transgén humano para la proteína hAPP mutada, y por tanto no expresaban A β .

El recuento celular mediante estereología de la población de neuronas SOM-positivas en la corteza perirrinal se expresó como densidad numérica (células/mm³) (Fig. 3.4.11). A los 4 meses de edad, no se encontraron diferencias significativas entre los animales APP/PS1 y los animales WT en ninguna de las dos regiones de la corteza perirrinal. Sin embargo, a los 6 meses, la densidad de células SOM-positivas fue significativamente menor en las capas profundas del área 35 (-60,73 \pm 10,08%) y del área 36 (-56,97 \pm 8,92%) en los animales dobles transgénicos en comparación con los animales WT de la misma edad. A los 12 meses, esta disminución en las capas profundas fue del 49,71 \pm 16,81% en el área 35 y del 44,59 \pm 15,52% en el área 36. No se observaron diferencias significativas en la densidad numérica de esta población en las capas superficiales a ninguna de las edades cuantificadas, ni en el área 35 ni en la 36. Por tanto, aproximadamente la mitad de la población de neuronas SOM-positivas se encontraba severamente afectada desde edades muy tempranas en este modelo de la enfermedad de Alzheimer, ya que los cambios a 6 y 12 meses fueron muy similares.

Estos resultados mostraron una vulnerabilidad selectiva dependiente de la localización laminar de las células SOM-positivas en la corteza perirrinal de los animales APP/PS1 desde edades tempranas.

Con la idea de determinar qué subpoblación de neuronas SOM-positivas era la más vulnerable a la patología en este modelo animal, realizamos un estudio de colocalización con la sintasa del óxido nítrico neuronal, nNOS (Fig. 3.4.12). Las neuronas que expresan nNOS constituyen

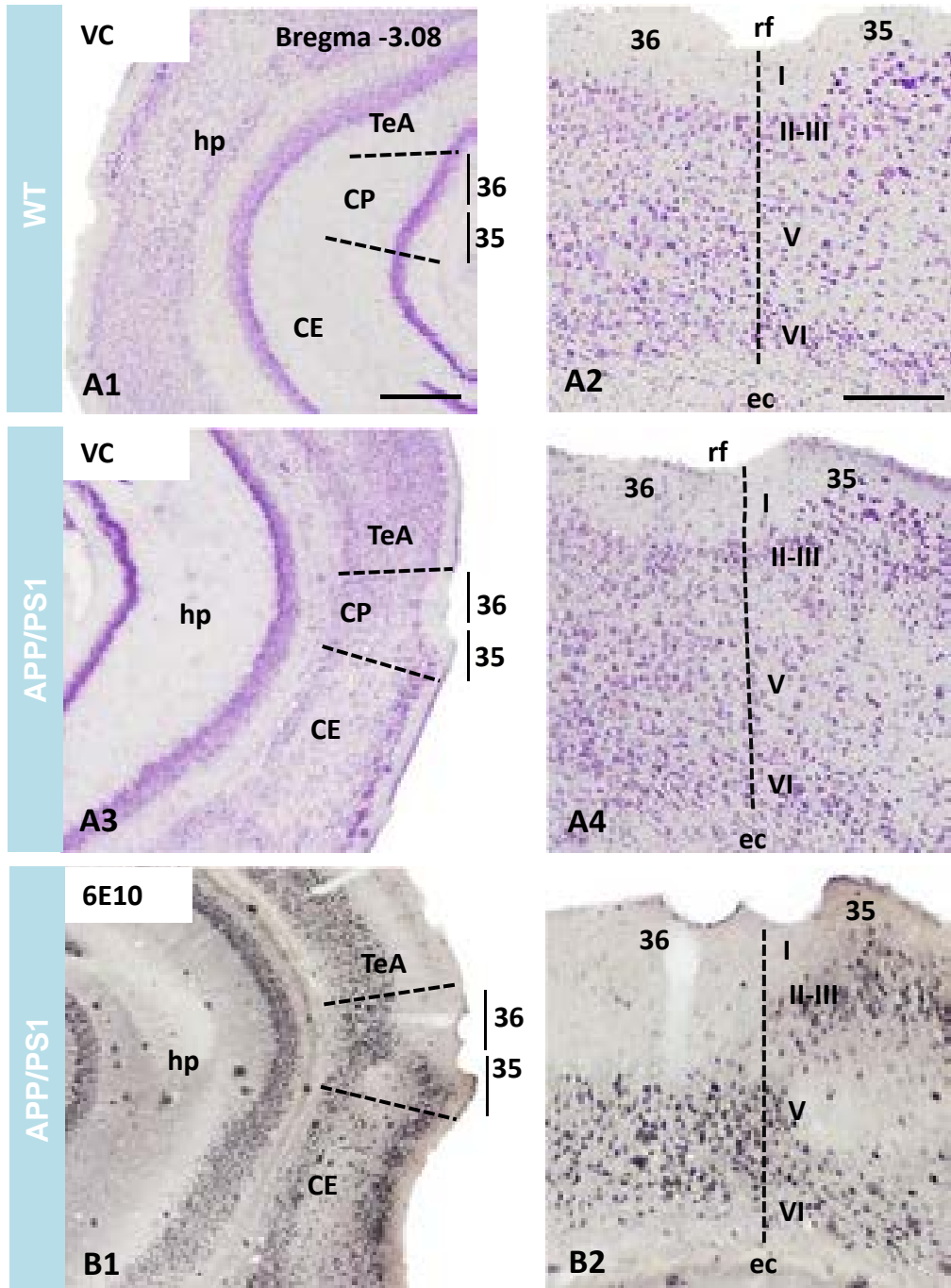


Figura 3.4.9. Delimitación anatómica de la corteza perirrinal en el cerebro del ratón WT (A1-A2) y transgénico APP/PS1 (A3 y A4; B1 y B2). Secciones coronales de cerebro teñidas con violeta de cresilo (VC) (A1-A4) y con el anticuerpo 6E10 (B1-B2). La corteza perirrinal se divide en dos áreas adyacentes, área 35 y área 36, situadas alrededor del surco rinal (rf) a niveles telencefálicos intermedio caudales. La inmunotinción con 6E10 tiñe diferencialmente las capas del área 35 y 36 permitiendo su diferenciación; en el área 35 se tiñen las neuronas de las capas II-III y VI mientras que en el área 36 se tiñen aquellas de las capas V y VI. *Hp*: hipocampo; *CE*: corteza entorrinal; *CP*: corteza perirrinal; *TeA*: corteza asociativa temporal; *ec*: cápsula externa; *rf*: surco rinal. Barra de escala: A1, A3 y B1: 500 μ m; A2, A4 y B2: 200 μ m.

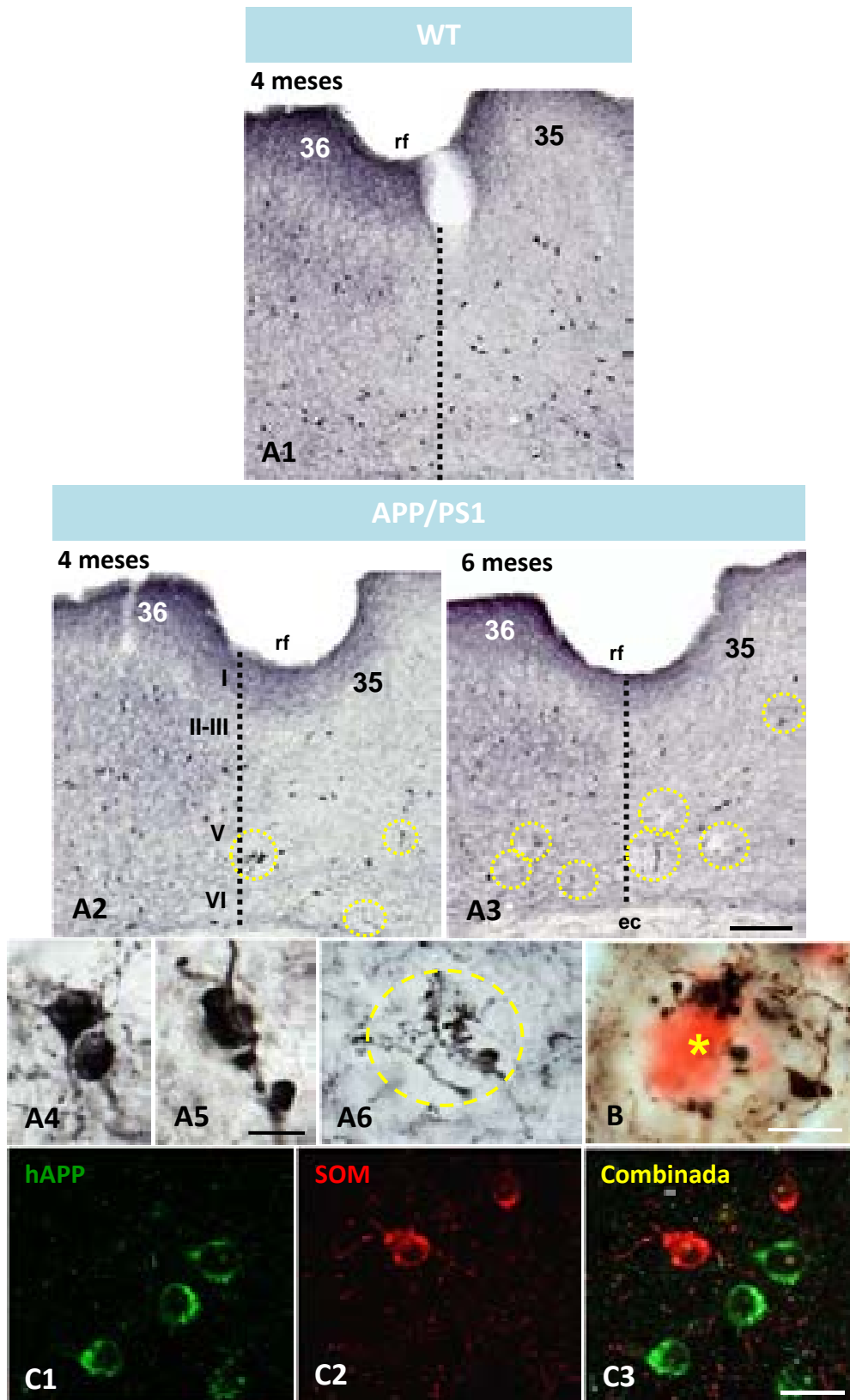
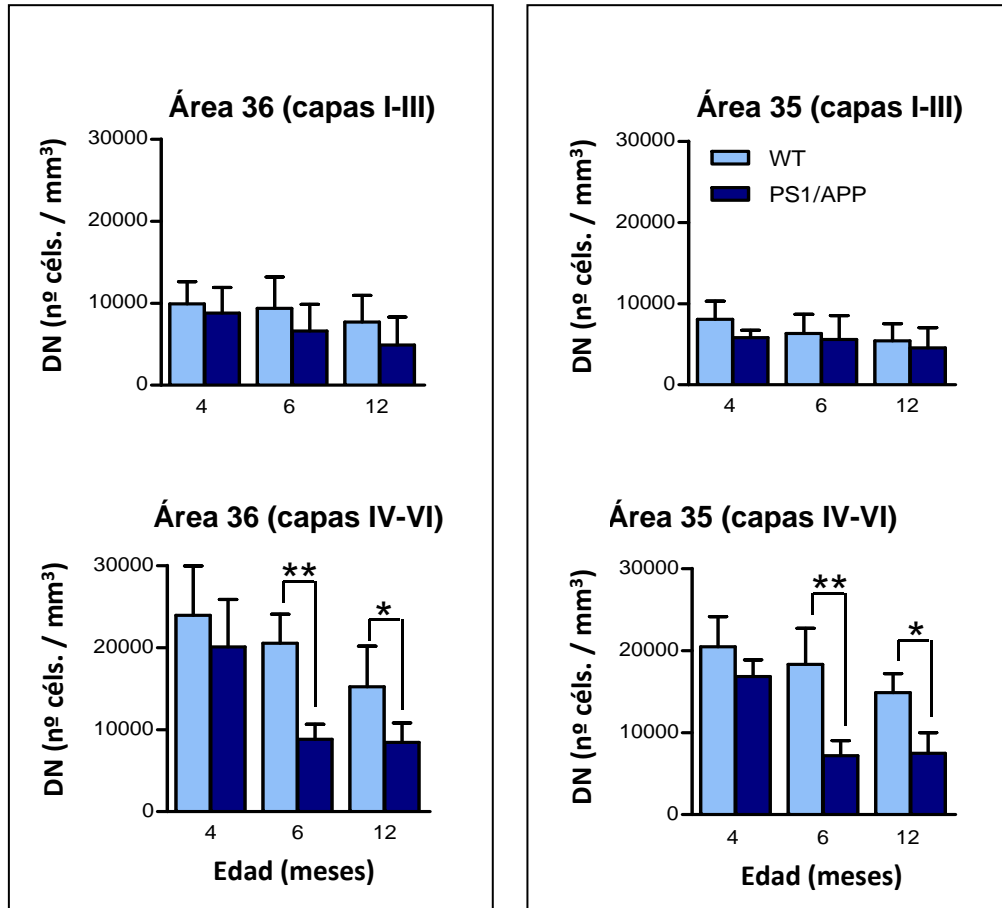


Figure 3.4.10. Degeneración de la población de interneuronas SOM-positivas en la corteza peririnal de los transgénicos PS1/APP desde edades tempranas. Inmunohistoquímica para SOM en animales WT (A1) y APP/PS1 (A2-A4). Las áreas 35 y 36 muestran un patrón diferencial de inmunotinción, presentando el área 36 un abundante neuropilo inmunorreactivo. La cantidad de somas positivas disminuye, mientras que la de distrofias aumenta en los animales transgénicos. A4, detalle a mayores aumentos de neuronas SOM-positivas; A5, detalle de axones distróficos; A6, detalle de distrofias agrupadas; B, distrofias SOM-positivas rodeando una placa fibrilar (teñida con rojo congo, asterisco). C1-C3) Doble inmunofluorescencia SOM/hAPP demostrando que las neuronas SOM-positivas no expresan la forma humana mutada del gen *APP*. Barra de escala: A1-A3: 100 μ m; A4 y A5: 10 μ m; A6, B y C1-C3: 20 μ m.



N=4; ADEVA de una vía; $F(3, 10) = 14,428$; $P=0,001$; Test de Bonferroni, $*p<0,05$, $**p<0,01$.

Figure 3.4.11. Reducción significativa de interneuronas SOM-positivas en las capas profundas de la corteza entorrinal de ratones transgénicos APP/PS1 desde los 6 meses de edad. Estudio cuantitativo por estereología de la población de neuronas SOM-positivas en capas superficiales y profundas de las áreas 35 y 36 de la corteza perirrinal de animales WT y APP/PS1 de 4, 6 y 12 meses de edad. La densidad de neuronas SOM-positivas es mayor en las capas profundas que en las superficiales en ambas áreas. A partir de los 6 meses de edad se produce una reducción significativa de estas neuronas de capas profundas en los animales transgénicos respecto a los WT de la misma edad.

una pequeña población en la corteza perirrinal, y todas ellas coexpresan SOM (Fig. 3.4.12 A1-A3). Estas neuronas se encuentran a lo largo de todas las capas corticales II a VI, pero principalmente se concentran en las capas profundas de ambas áreas 35 y 36. Al igual que las células SOM, las neuronas nNOS mostraron una morfología multipolar con dendritas primarias ligeramente ramificadas.

Como en el caso de la somatostatina, la inmunorreactividad para nNOS fue prácticamente la misma en los ratones APP/PS1 y WT de la misma edad. Al igual que para SOM, se observaron neuritas distróficas nNOS-positivas a partir de 4 meses de edad en los animales APP/PS1, aumentando en número y tamaño a los 6 y 12 meses. Las distrofias nNOS-positivas siempre se observaron en estrecha asociación con placas de A β (Fig. 3.4.12 A4-A6)

Se analizó la colocalización de la somatostatina con nNOS en neuronas de la corteza perirrinal tanto en ratones APP/PS1 como WT, a los 4, 6 y 12 meses de edad. Todas las neuronas nNOS que se examinaron, independientemente de la edad y el genotipo de los ratones (un total de 178 neuronas en ratones APP/PS1, y 200 neuronas en ratones WT) fueron inmunorreactivas para la somatostatina, lo que indica una colocalización al 100% entre estos dos marcadores en la población de las neuronas nitrérgicas (Fig. 3.4.12 A3). Además, el análisis por microscopía confocal de secciones de doble inmunofluorescencia reveló colocalización de somatostatina y nNOS incluso en las neuritas distróficas (Fig. 3.4.12 A6). Puesto que había más neuronas SOM-positivas que neuronas nitrérgicas, nuestros datos indican que las neuronas nNOS son, de hecho, una subpoblación de neuronas SOM-positiva en la corteza perirrinal.

El examen cualitativo de las secciones teñidas con nNOS mostró que, contrariamente a la somatostatina, no hubo una reducción relacionada con la edad en el número de neuronas nNOS-positivas en el ratón transgénico APP/PS1. Se realizó un estudio cuantitativo por estereología en las capas profundas de la corteza perirrinal de la densidad de neuronas nNOS-positivas (Fig. 3.4.12 B). Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas relacionadas con la edad en el número de neuronas nNOS en ambas áreas 35 y 36 en ratones APP/PS1 ni en los ratones WT.

En paralelo al proceso neurodegenerativo que tuvo lugar en la población de interneuronas SOM-positivas de las capas profundas de la corteza perirrinal, el modelo APP/PS1 presentó acumulación extracelular del péptido β -amiloide, también desde edades tempranas, en el hipocampo propio (Ramos et al. 2006), subículo (Trujillo-Estrada et al. 2014) y corteza entorrinal (Moreno-Gonzalez et al. 2009). Por este motivo, quisimos analizar si las capas profundas de la corteza perirrinal de los ratones transgénicos presentaban también depósitos amiloides desde los 4 meses de edad, momento en el que se estaba produciendo la muerte neuronal. Mediante inmunohistoquímica para el péptido A β 42 se pudo detectar acumulación extracelular desde los 4 meses de edad, que afectó únicamente a las capas profundas de ambas regiones de la corteza perirrinal, aunque los agregados A β 42 positivos fueron más grandes en el área 35 (Fig. 3.4.13 A1). A los 6 meses de edad, los depósitos amiloides incrementaron en número y tamaño, involucrando también las capas superficiales del área 35 (Fig. 3.4.13 A2), y a los 12 meses de edad, las placas aparecieron a lo largo

de toda la laminación cortical en ambas áreas de la corteza perirrinal, afectando en mayor medida al área 35 (Fig. 3.4.13 A3).

Las formas fibrilares del A β también se analizaron, utilizando para ello el colorante Tioflavina S, específico de conformación. El patrón de tinción fue similar al descrito para el péptido A β 42. Así, el marcaje comenzó a detectarse a los 4 meses, principalmente en las capas profundas de ambas regiones de la corteza perirrinal, correspondiéndose con depósitos extracelulares fibrilares de pequeño tamaño (Fig. 3.4.13 B1). A los 6 meses de edad, aumentó el número y el tamaño de las placas positivas para Tioflavina S, aunque todavía se localizaban mayoritariamente en las capas profundas del área 35 (Fig. 3.4.13 B2), y ya, a la edad avanzada de 12 meses, tanto el número como el tamaño de las placas incrementaron considerablemente por toda la columna cortical (Fig. 3.4.13 B3).

Por tanto, en el estudio cualitativo de los depósitos extracelulares de A β se observó que las placas se forman preferentemente en las capas profundas de la corteza perirrinal a edades tempranas. Para comprobarlo, se realizó un estudio cuantitativo comparativo de la carga de A β entre las capas superficiales (I-III) y profundas (IV-VI) en ambas regiones de la corteza perirrinal de animales dobles transgénicos desde los 4 a los 12 meses de edad (Fig. 3.4.13 C). Mediante análisis de imagen por densitometría, se calculó el tanto por ciento de las áreas 35 y 36 ocupadas por las placas amiloides fibrilares (positivas para Tioflavina S). La carga amiloide incrementó significativamente con la edad, tanto en las capas profundas como en las superficiales en el área 35 de la corteza perirrinal, y tan solo en las capas profundas en el área 36 (Fig. 3.4.13 C). Y además, el incremento más notable se produjo entre los 6 y los 12 meses de edad en las capas profundas de ambas regiones (5,1 y 7 veces más carga amiloide en las capas profundas del área 35 y 36, respectivamente, a los 12 meses que a los 6 meses de edad), coincidiendo espacial y temporalmente con la muerte de interneuronas SOM-positivas.

Por último, se analizó la evolución temporal del porcentaje de placas en función del tamaño de éstas (placas de menos de 200 μm^2 , entre 200 y 500 μm^2 , entre 500 y 2000 μm^2 y placas mayores de 2000 μm^2) desde los 4 a los 12 meses de edad en las capas profundas de ambas regiones de la corteza perirrinal, y se representó en un histograma apilado para apreciar con claridad los resultados (Fig. 3.4.13 D). En ambas regiones, el porcentaje de placas pequeñas (de menos de 200 μm^2) fue disminuyendo con la edad a partir de los 6 meses, a medida que las placas grandes (de más de 500 μm^2) iban aumentando en proporción con respecto al total. Además, las placas más grandes (de más de 2000 μm^2) aparecieron antes (a los 4 meses) en el área 35 que en la 36, donde únicamente se observaron a partir de los 12 meses.

Tras comprobar que, al igual que en las muestras humanas de los pacientes de Alzheimer, en el modelo APP/PS1 la población de interneuronas SOM de la corteza perirrinal es altamente vulnerable al proceso neurodegenerativo y que coincide con el desarrollo de la patología amiloide, el siguiente paso fue analizar la población de interneuronas PV-positivas utilizando técnicas

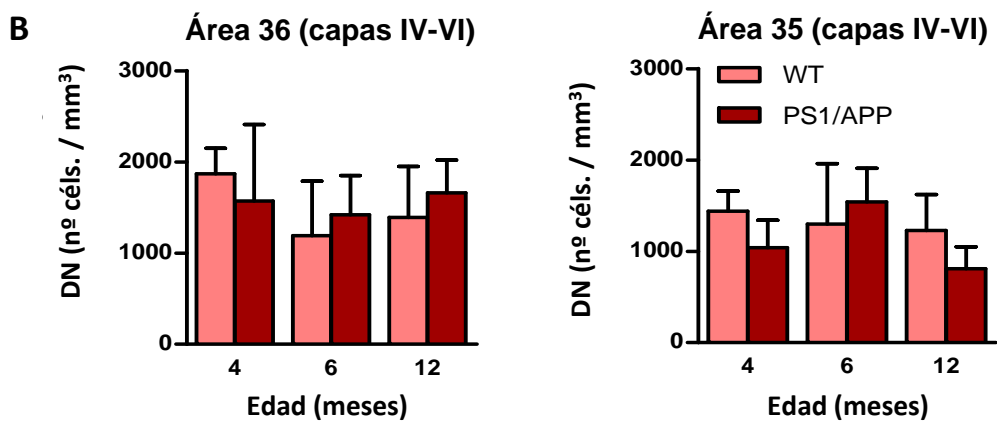
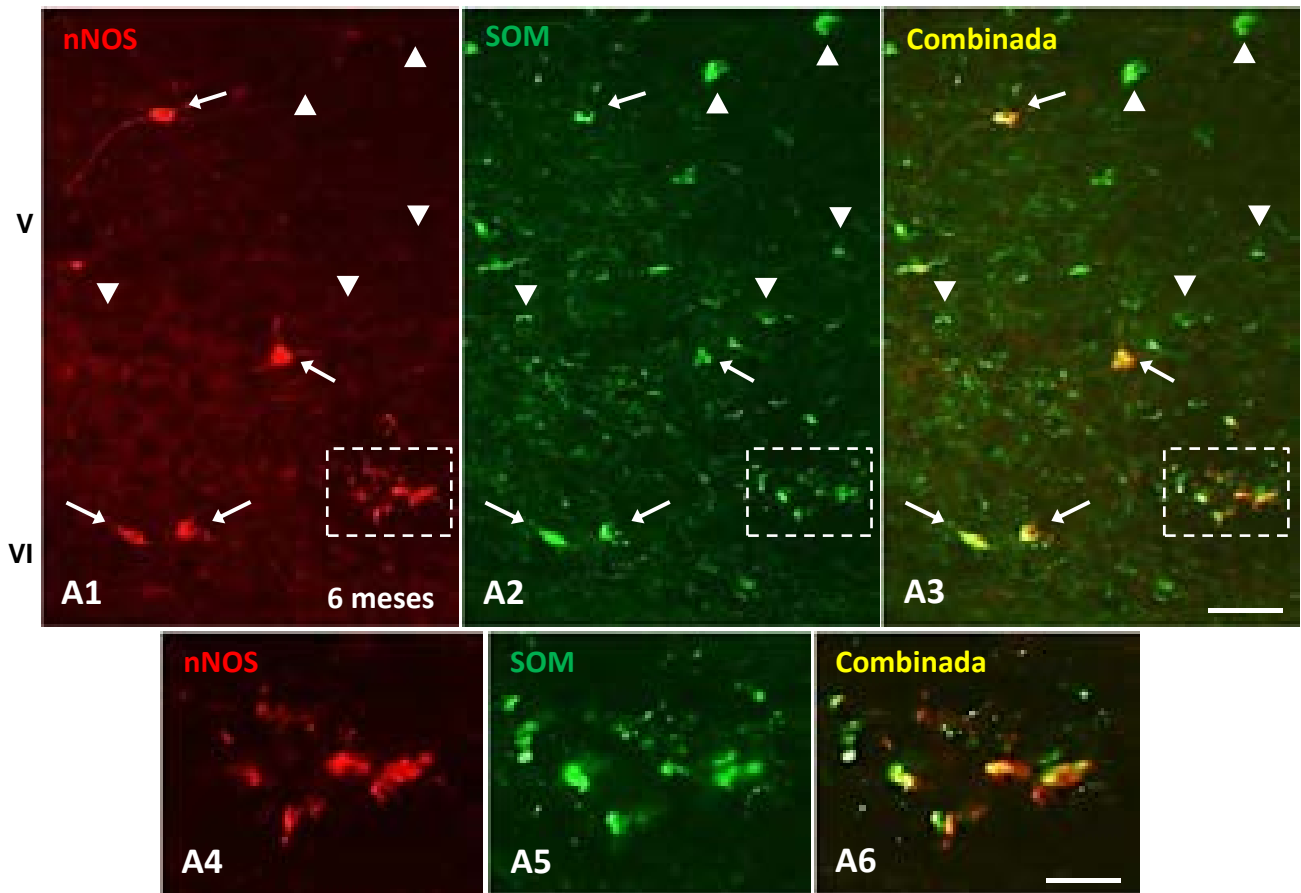


Figura 3.4.12. La subpoblación de neuronas SOM-positivas que expresan nNOS no se encuentra afectada en la corteza perirrhinal del modelo APP/PS1. Doble inmunofluorescencia para nNOS (A1, A4) y SOM (A2, A5) en capas profundas (V-VI) de corteza perirrhinal de animales transgénicos de 6 meses de edad. Las imágenes combinadas revelan que todos los cuerpos neuronales nNOS-positivos (A3) y las distrofias axonales (A6; es un detalle del recuadro en A3) expresan SOM. B) Estudio cuantitativo por esterología de neuronas nNOS en las capas profundas de las áreas 35 y 36 de la corteza perirrhinal de animales WT y APP/PS1 de 4, 6 y 12 meses de edad. No se detectan cambios significativos en esta población entre ambos genotipos a ninguna de las edades analizadas. Barras de escalas: A1-A3: 50 μ m; A4-A6: 20 μ m.

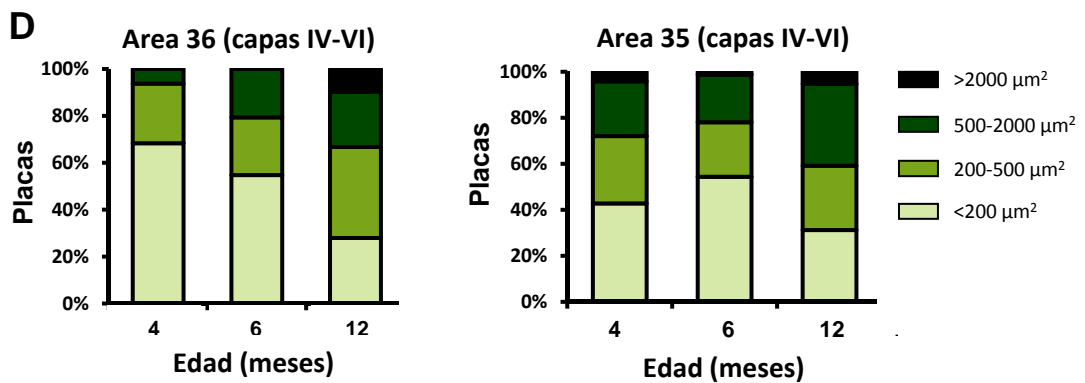
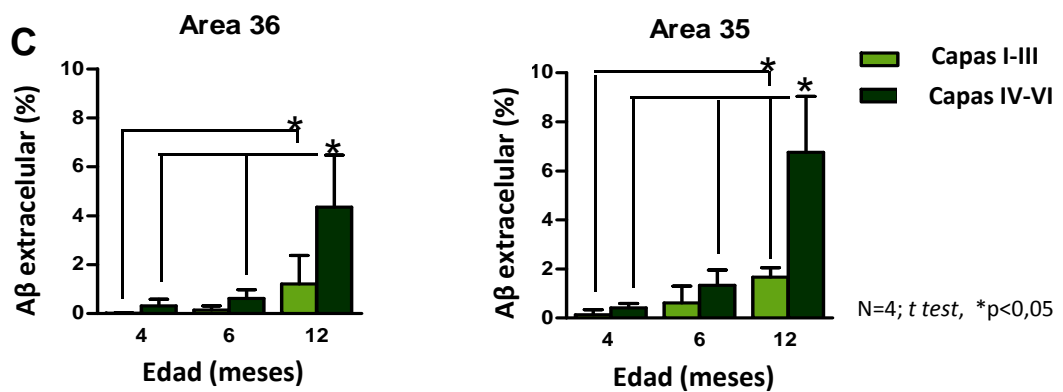
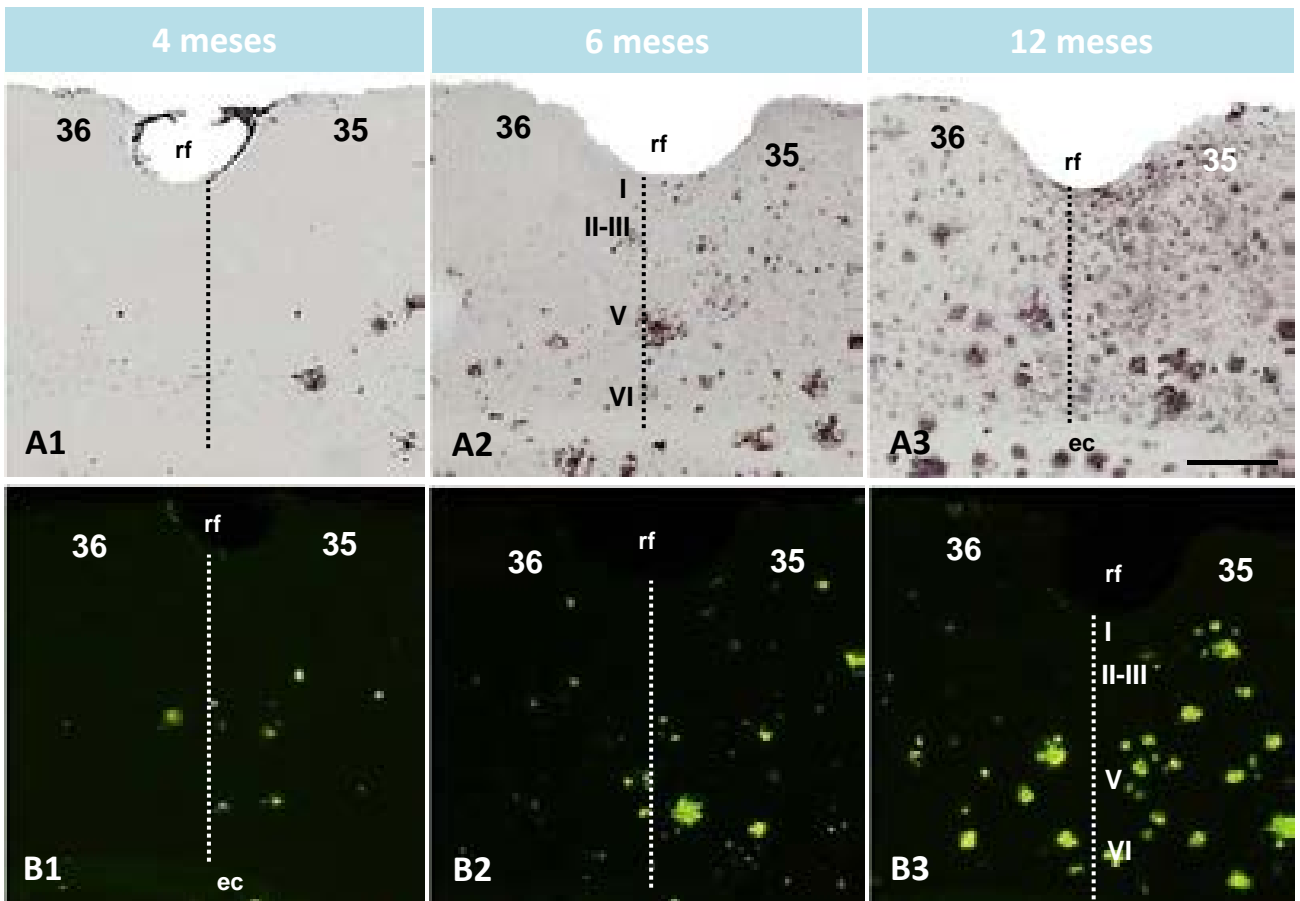


Figura 3.4.13. Progresión con la edad de la patología amiloide extracelular en la corteza perirrinal de los animales transgénicos APP/PS1. Inmunotinción para Abeta42 (A1-A3) y tinción de Tioflavina-S para placas fibrilares (B1-B3). La acumulación de Abeta empieza antes en el área 35 y después en la 36, siendo las capas profundas las más afectadas. C) La carga amiloide aumenta gradualmente con la edad en ambas áreas, siendo mayor en las capas profundas (IV-VI). D) En ambas áreas el porcentaje de placas de tamaño mediano/grande incrementa con la edad. Barra de escala: A1-A3 y B1-B3: 200 μm .

Resultados

inmunohistoquímicas en animales APP/PS1 de 4 a 18 meses en comparación con animales WT de la misma edad (Fig. 3.4.14).

Estas neuronas GABAérgicas presentaban una morfología multipolar, bipolar o bipenacheada en ambos genotipos y se distribuyeron entre las capas II y VI de la corteza perirrinal, aunque fundamentalmente se localizaban en la capa V. Las capas II-III y V (donde se encuentran los somas de neuronas piramidales a las que inervan) del área 35 presentaron una gran densidad de plexos inmunopositivos para PV en comparación con las mismas capas del área 36.

El estudio inmunohistoquímico no mostró ninguna diferencia entre ambos genotipos en cuanto a la distribución, morfología o densidad de somas a ninguna de las edades analizadas (ni a edades tempranas ni tardías) (Fig. 3.4.14 A1-A3). Tampoco se observaron neuritas distróficas PV-positivas alrededor de las placas en los animales APP/PS1 en ningún caso (Fig. 3.4.14 A4). El recuento celular estereológico de la población de interneuronas PV-positivas en las capas profundas de ambas regiones de la corteza perirrinal a las edades de 6 y 18 meses demostró que no existían diferencias significativas en la densidad numérica (células/mm³) entre los genotipos control y doble transgénico (Fig. 3.4.14 D).

Por consiguiente, la ausencia de neuritas distróficas y de cambios en la densidad neuronal parece indicar que esta subpoblación de interneuronas presenta un fenotipo resistente a los procesos neurodegenerativos asociados al péptido amiloide que acontecen en la corteza perirrinal de los animales transgénicos y, por lo tanto, este modelo murino APP/PS1 no mimetiza la pérdida de interneuronas parvalbúmina positivas ocurrida tanto en el hipocampo como en la corteza perirrinal de los pacientes de Alzheimer.

Finalmente, y en colaboración con el Dr. Vitorica (Universidad de Sevilla), se realizó un ensayo *in vitro* de toxicidad neuronal de las fracciones solubles S1 del hipocampo de ratones APP/PS1 (Fig. suplementaria 3.9). Los resultados revelaron un efecto tóxico de las fracciones solubles sobre las neuronas primarias cuantificado mediante *western blot* para el marcador NeuN (Fig. suplementaria 3.9 A). Este efecto tóxico fue dependiente de la edad del animal (18 meses > 6 meses) y del tiempo de incubación (no mostrado). Sin embargo, en el mismo cultivo, los niveles de expresión del ARNm para parvalbúmina (que reflejaría únicamente la población neuronal PV-positiva) no sufrió ninguna alteración significativa tras el tratamiento (Fig. suplementaria 3.9 B). Estos datos ponen de manifiesto que las interneuronas parvalbúmina son resistentes *in vitro* a la presencia de A β soluble procedente de los cerebros de modelos APP/PS1, en concordancia con los datos obtenidos mediante inmunohistoquímica y cuantificación estereológica. En la actualidad se encuentran en marcha experimentos destinados a comprobar si las fracciones solubles procedentes de pacientes de Alzheimer son tóxicas para esta población de interneuronas.

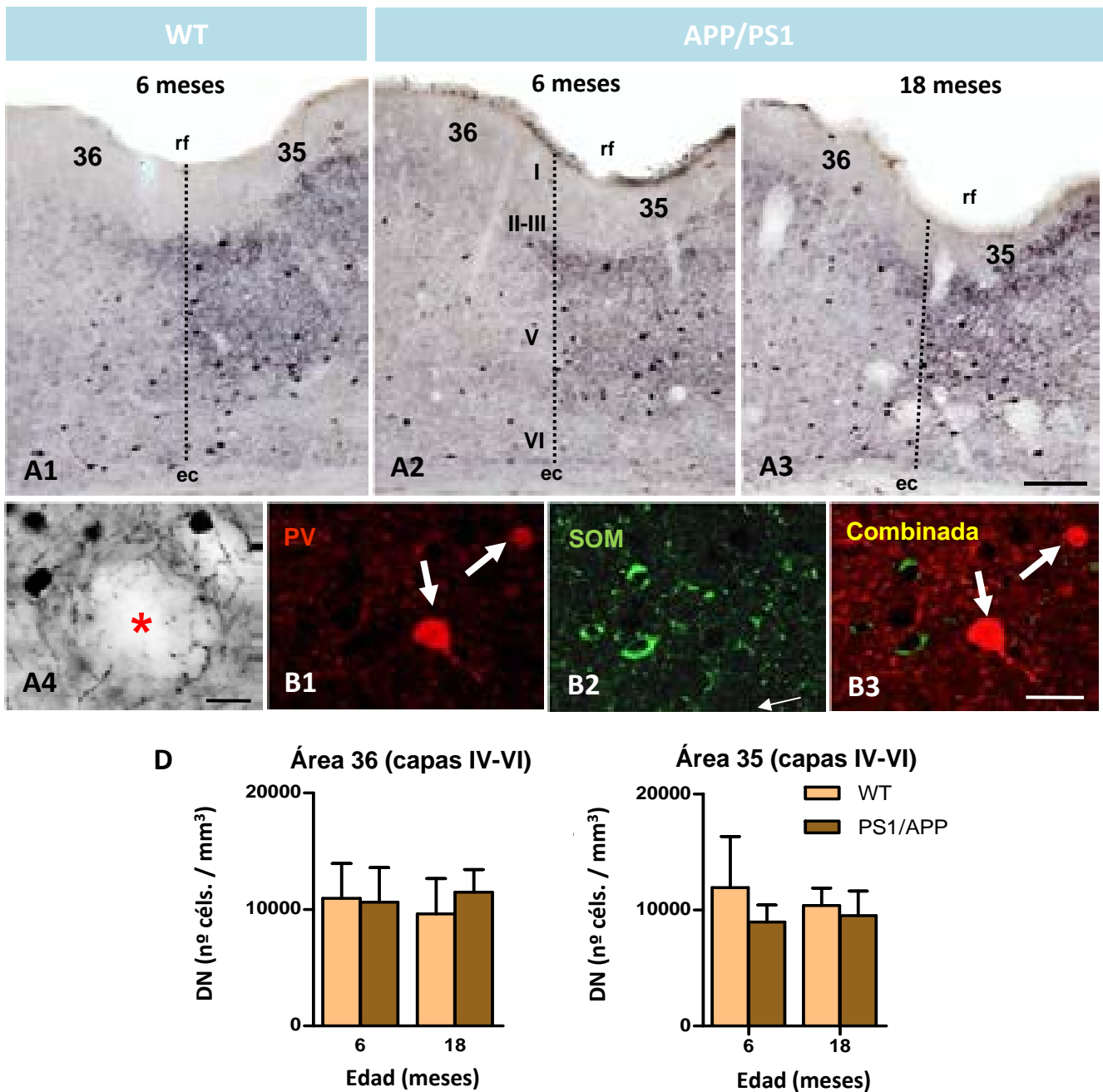


Figure 3.4.14. La población de interneuronas PV-positivas es resistente al proceso degenerativo en la corteza perirrinal del modelo transgénico APP/PS1. Inmunohistoquímica para PV en animales WT (A1) y APP/PS1 (A2-A3). Las áreas 35 y 36 muestran un patrón diferencial de inmunotinción, presentando el área 35 un abundante neuropilo inmunorreactivo en capas II-V. La cantidad de somas positivas no se ve afectado con la edad ni se observan neuritas distróficas PV-positivas en la periferia de las placas (ver detalle en A4; el asterisco indica placa amiloide) en los animales transgénicos. La inmunofluorescencia doble PV/SOM (B1-B3) revela que son poblaciones diferentes. C) el recuento estereológico de la densidad de neuronas PV-positivas en capas profundas de animales WT y APP/PS1 de 6 y 18 meses de edad no revela diferencias significativas entre ambos genotipos. Barra de escala: A1-A3: 100 μ m; A4 y B1-B3: 20 μ m.

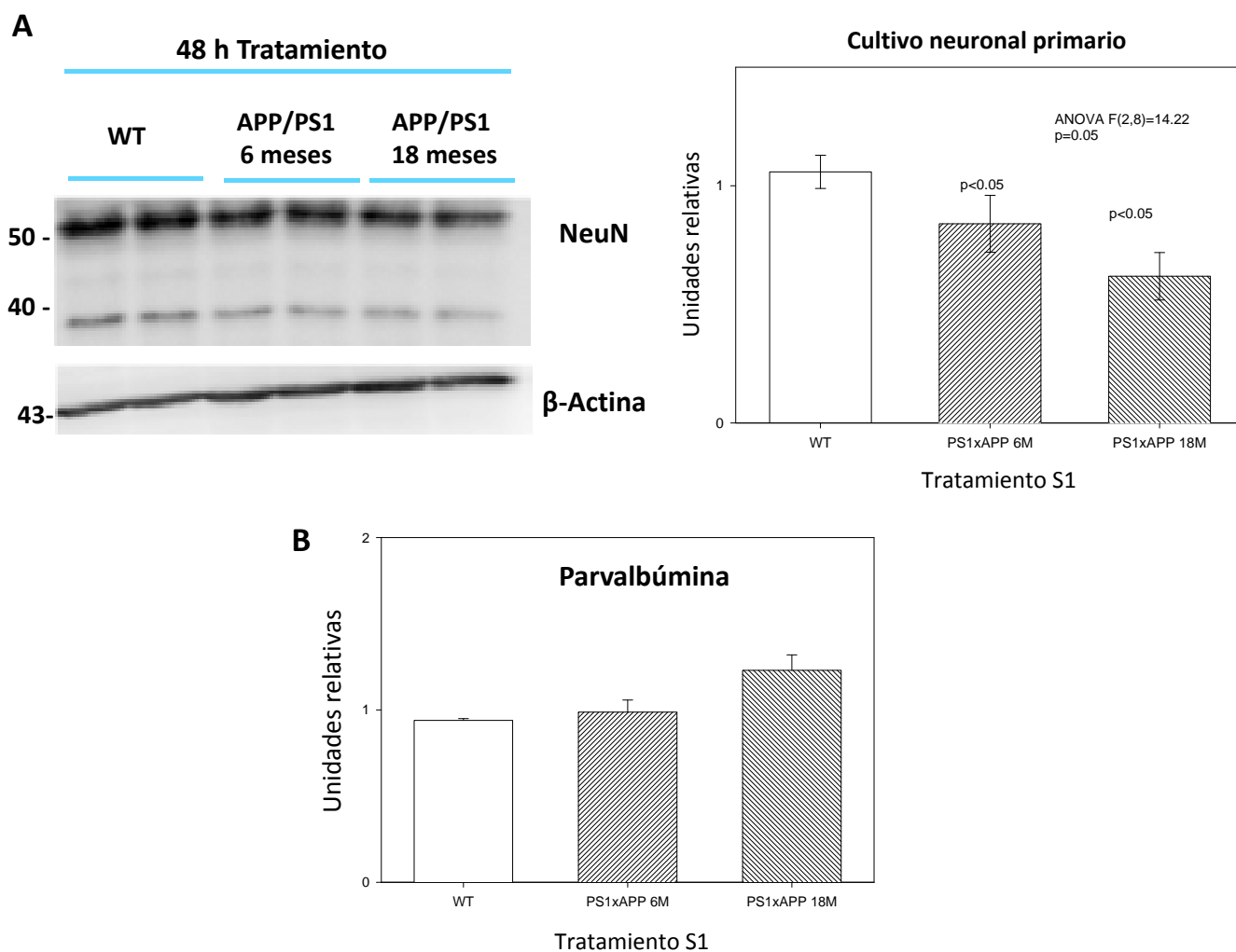


Figura suplementaria 3.9. Las interneuronas parvalbúmina son resistentes *in vitro* a la presencia de A β soluble procedente de cerebro de modelos APP/PS1. A) Las fracciones S1 procedentes de hipocampo del modelo APP/PS1 producen toxicidad neuronal *in vitro*, determinada por la expresión (*western blot*) del marcador NeuN. Este efecto tóxico es dependiente de la edad del animal (18 meses > 6 meses) y del tiempo de incubación (no mostrado). B) Sin embargo, en el mismo cultivo, la expresión (qPCR) de PV no sufre ninguna alteración significativa a este tratamiento. Resultados obtenidos en colaboración con el Dr. Javier Vitorica de la Universidad de Sevilla.

Capítulo 3.5.

EFFECTO DE LA INHALACIÓN DEL HUMO DEL TABACO SOBRE LAS ALTERACIONES NEUROPATOLÓGICAS QUE PRESENTA EL MODELO TRANSGÉNICO DE ALZHEIMER APPSWE/PS1DE9

Nature Communication. 2013; 4: 1495. doi: 10.1038/ncomms2494

Smoking Exacerbates Amyloid Pathology in a Mouse Model of Alzheimer's Disease

Ines Moreno-Gonzalez¹, Lisbell D Estrada², Elisabeth Sanchez-Mejias³, Claudio Soto¹

¹Mitchell Center Alzheimer's Disease and Related Brain Disorders; Department of Neurology; University of Texas Houston Medical School; Houston, TX, USA. ²Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. ³CIBERNED, Department of Cell Biology, University of Malaga, Spain.

Abstract

Several epidemiological studies have shown that cigarette smoking might alter the incidence of Alzheimer's disease. However, inconsistent results have been reported regarding the risk for AD among smokers. Previous studies in experimental animal models have reported that administration of some cigarette components (e.g. nicotine) alters amyloid- β aggregation, providing a possible link. However, extrapolation of these findings towards the *in vivo* scenario is not straightforward since smoke inhalation involves a number of other components. Here we analyze the effect of smoking under more relevant conditions. We expose AD transgenic mice to cigarette smoke and analyze the neuropathological alterations in comparison with animals not subjected to smoke inhalation. Our results show that smoking increases the severity of some abnormalities typical of AD, including amyloidogenesis, neuroinflammation and tau phosphorylation. Our findings suggest that cigarette smoking may increase AD onset and exacerbate its features and thus, may constitute an important environmental risk factor for AD.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common type of senile dementia in the elderly population. Histopathologically, AD is characterized by the extracellular accumulation of misfolded amyloid-beta ($A\beta$) into senile plaques and the formation of neurofibrillary tangles (NFTs), which are filamentous intracellular inclusions formed by hyperphosphorylated tau. Other AD lesions include a massive inflammatory response, characterized by activated microglia and reactive astrocytes, synaptic impairment, and neuronal loss in selective areas of the brain^{1,2}. The etiology of sporadic AD is not well known, but several risk factors have been shown to increase the probability to develop the disease³. Although the main risk factor for AD is aging, various others factors have also been proposed, including gender, ApoE polymorphism, the co-existence of other disorders (such as cardiovascular diseases, brain injury, diabetes, Down syndrome), and several lifestyle conditions, including physical activity, education, diet or smoking^{4,5}.

The effects of smoking on AD remain unclear. For many years, smoking was considered to be protective for the development of AD^{6,7}. It was proposed that acute stimulation of neuronal nicotinic receptors may have beneficial effects on people with AD⁸ and that prolonged administration may

have further benefits by increasing neuronal survival⁹. Furthermore, it was reported that nicotine can decrease amyloid precursor protein (APP) secretion in animal models^{10, 11}, inhibit acquisition of beta-sheet conformation by A β peptide¹², diminish its aggregation¹³, reduce β -amyloidosis¹⁴ and prevent memory impairment¹⁵. In fact, cotinine, the main metabolite of nicotine, is able to reduce A β deposition by inhibiting its oligomerization and decrease memory impairment in transgenic AD mice¹⁶. Moreover, some studies have found that smoking is able to reduce A β 42 levels both in control and AD patients¹⁷. However, more recent epidemiological studies have demonstrated that smoking could increase the risk of AD¹⁸⁻²¹. A detailed risk assessment study concluded that nearly 14% of AD cases are potentially attributable to smoking, and thus a 25% reduction in smoking frequency could potentially lower AD prevalence by many hundred thousand cases worldwide³. Moreover, histopathological studies showed that smokers have more severe neuropathological alterations than those who have never smoked, including neurofibrillary changes and neuritic plaques^{22, 23}. To explain the discrepancy in the results, it was proposed that the deleterious effect of smoking on AD may have been masked by the fact that subjects who would have subsequently developed AD had either died or left the study due to other co-morbidities^{24, 25}. From the mechanistic viewpoint, it has been reported that nicotine exacerbates tau phosphorylation both in mouse and rat models of AD^{26, 27}. In addition, it has been also described that smoking can directly induce cognitive impairment^{28, 29}.

In the present study, we investigated the effects of smoking on amyloid burden, inflammatory response, tau phosphorylation and neurodegeneration in the hippocampus and cortical area in a double transgenic mouse model of AD. We found that smoking exacerbates Alzheimer's-like pathology in this *in vivo* model of AD.

Methods

Transgenic mice. APP^{swe}/PS1^{dE9} (B6C3-Tg (APP^{swe}, PSEN1^{dE9}) 85Dbo/J, The Jackson Laboratory) double transgenic mice express a chimeric mouse/human amyloid precursor protein containing the Swedish mutation (Mo/HuAPP695^{swe}) and a mutant human presenilin 1 (PS1^{dE9}) gene. The generation and initial characterization of these mice has been reported previously^{34, 35}. APP/PS1 animals develop amyloid deposits by 5-6 months old mostly located in the hippocampus, cortex and subiculum and display behavioral impairment by 13 months of age. Animals were housed in groups of up to 5 in individually ventilated cages under standard conditions (22 °C, 12 h light-dark cycle) receiving food and water ad libitum. All animal experiments were carried out in accordance with the NIH regulations.

Cigarette smoke exposure. Two groups of male and female APP/PS1 transgenic animals (n=5-6/group) were each subjected to two separate smoking exposure conditions during four months. Transgenic mice were subjected to both mainstream and sidestream smoke obtained from a commercial brand (Marlboro Light™) using a specially designed non-ventilated chamber containing a peristaltic pump that sucked the smoke from the cigarette with an airflow rate of 80 mL/min (**Fig. 1**).

In the high dose treatment, transgenic mice were exposed daily (five days per week) for 60 minutes to the smoke generated from one cigarette. A second group of mice received a low dose of smoke defined as 30 minutes in the smoking chamber containing the smoke of half a cigarette. Control animals were exposed to room air in an identical chamber. Treatment started at the age of 3 months, and animals were sacrificed at 7 months of age, when amyloid plaques are starting to appear in this model.

Cotinine determination in blood. Exposure to tobacco smoke can be detected by measuring nicotine metabolites (e.g. cotinine) in blood, since cotinine has a longer half-life than nicotine. Cotinine plasma levels were measured by using a competitive mouse/rat cotinine ELISA kit (Calbiotech). Blood samples were obtained via tail venipuncture 1 hour before, and 1, 2 and 3 days after smoke exposure (immediately after exposure). To obtain plasma samples, blood was collected in EDTA-coated tubes and centrifuged at 2,000xg for 20 min. Plasma was separated and stored at -80 °C until used. Proteins from the plasma fraction were loaded directly onto ELISA plates and treated according to the manufacturer's recommendations. Samples were loaded in duplicate, and absorbance was read at 450 nm on an ELISA plate reader (EL800 BioTek).

Immunohistochemistry. Mice were sacrificed by CO₂ inhalation and perfused transcardially with PBS. Brains were removed, post-fixed into fixative solution (10% neutral buffered formalin) and embedded in paraffin. Serial sections (one out of ten sections) from all animal groups (n=5-6/group; 4 sections/stain/animal) were processed in parallel for immunostaining using the same solutions to minimize variability in staining conditions. Deparaffinized 10- μ m-thick sections were used for immunohistochemical staining. After blocking the endogenous peroxidase activity with 3% H₂O₂ - 10% methanol in PBS, pH 7.4 for 20 min, sections were incubated overnight at room temperature in one of the primary antibodies: mouse anti-4G8 (1:1,000 Covance); rabbit anti-Iba1 (1:1,000 Wako); rabbit anti-GFAP (1:1,000 Abcam); mouse anti-ptau (1:100 AT8, Pierce); or rabbit anti-NeuN (1:1,000 Millipore). Primary antibody was detected by incubating 1 hour with the corresponding HRP-linked secondary antibody: sheep anti-mouse or donkey anti-rabbit (1:1,000 GE Healthcare). Peroxidase reaction was visualized using DAB Kit (Vector) following the manufacturer's instructions. For counterstaining, sections were incubated in Harris hematoxylin for 1 min (Fisher). Finally, sections were dehydrated in graded ethanol, cleared in xylene, and coverslipped with DPX mounting medium and examined under a bright field microscope (DMI6000B, Leica).

Fluorescent staining. For Thioflavin-S (ThS, Sigma) staining, sections were incubated in ThS solution (0.025% in 50% ethanol) for 5 min after deparaffinization, rinsed, coverslipped with mounting medium for fluorescence (Vector), and immediately visualized using a fluorescence microscope. For double AT8/Thioflavin-S fluorescent labeling, sections were first incubated with the primary antibody followed by Alexa594 conjugated secondary antibody. Then, sections were washed and processed for Thioflavin-S staining and coverslipped with mounting medium for fluorescence to avoid photobleaching. Fluoro-Jade® C (FJC) (Millipore) staining was done to detect degenerating

neurons. Sections were deparaffinized and immersed in basic alcohol (1% sodium hydroxide in 80% ethanol) for 5 min. After rinsing them in 70% ethanol and distilled water, slides were incubated in 0.06% potassium permanganate solution for 10 min, washed and incubated for 10 min in 0.0001% FJC solution, and dissolved in 0.1% acetic acid. Finally, sections were dehydrated and covered with DPX mounting medium and examined under an epifluorescent microscope (DMI6000B, Leica).

Plaque size morphometric analysis and burden quantification. Four sagittal serial sections stained with 4G8 antibody from each group were analyzed using ImageJ 1.45s software for plaque size morphometry. Burden quantification was done through the lateromedial extent of the cortical and hippocampal areas in the sagittal plane (between 0.70 and 1.60 mm lateral to the midline), being the first section of each animal randomly collected. Quantification was assessed in every tenth section (with a distance of 100 μ m among them), and four 10 μ m sections were measured in each animal (n=5-6/group). Brain boundaries were defined according a standard mouse stereotaxic brain atlas. 10x objective was used for individual plaque measurement. Number of plaques/mm² falling into four surface categories (ranging from <200 μ m² to >2000 μ m²) was calculated. Photomicrographs were taken by using a DFC310 FX Leica digital camera, imported into ImageJ 1.45s software (NIH) and converted to black and white images. Threshold intensity was manually set and kept constant, and the number of pixels was determined for 4G8, ThS, Iba1 and GFAP immunostained sections to quantify amyloid load, fibrillar burden, microglial activation and reactive astrogliosis in hippocampal (CA1, CA2, CA3 and dentate gyrus), subiculum, and cortical areas (including motor, somatosensory, visual, frontal, parietal and retrosplenial cortex). Amyloid plaque density was performed manually using the same software by calculating the area and the number of plaques per total analyzed area. Each analysis was done by a single examiner blinded to sample identities.

Neuronal density analysis. The number of NeuN-immunopositive cells was counted using a bright field microscope (DMI6000B, Leica) 20x objective. Photomicrographs were taken by using a DFC310 FX Leica digital camera and imported into ImageJ 1.45s software (NIH). Quantification was done semi-automatically. Images were converted to black and white images, threshold intensity was set, and the number of particles was analyzed by circularity. Cell counting was done through the lateromedial extent of the cortical and hippocampal areas in the sagittal plane (between 0.70 and 1.60 mm lateral to the midline), including CA1, CA2, and CA3 areas of the hippocampus, subiculum, and cortical areas (motor, somatosensory, visual, frontal, parietal and retrosplenial cortex). As previously described, neurons were quantified in every tenth section, and four 10 μ m sections were measured in each animal (n=5-6/group). Brain boundaries were defined according a standard mouse stereotaxic brain atlas. The numerical density is expressed as neurons/mm². An investigator who was blind to the experiment performed neuronal profile counting.

Statistical analysis. Graphs are expressed as means \pm standard error (s.e.m.). After confirming normal distribution with Skewness and Kurtosis statistic test, one way analysis of variance (ANOVA) followed by a post-hoc Tukey's multiple comparisons test were used to analyze differences

among groups. For the size distribution analysis of plaques, we applied two-way ANOVA followed by Bonferroni test. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software Inc). For linear correlation, Pearson correlation coefficient was used. Statistical differences for all tests were considered significant at the $p < 0.05$ level.

Results

Cigarette smoke in APP/PS1 increases blood cotinine levels

APP/PS1 transgenic mice were exposed to both mainstream (smoke inhaled by an active smoker) and sidestream smoke (smoke from the burning end of a cigarette) in a non-ventilated exposure chamber, using a peristaltic pump that sucked the smoke from the cigarette with an airflow rate of 80 mL/min (**Fig. 1**). Smoke from a commercially available cigarette was administered 5 days/week in two different doses for four months. Treatment started when animals were 3 months of age and mice were sacrificed at 7 months old for analysis. The high dose group received the smoke of one cigarette during 60 minutes, whereas low dose group received half of a cigarette during 30 min. Control transgenic animals were exposed to room air only. To measure the amount of smoke taken by the mice, we analyzed the levels of cotinine in plasma during the treatment. Cotinine is the primary metabolite of nicotine and due to its longer half-life compared with nicotine, is used as a biomarker for cigarette smokers and those exposed to environmental tobacco smoke³⁰. In passive smokers, cotinine level in plasma is around 4.4 ng/mL, while for active smokers is higher than 10 ng/mL³¹, even after the administration of low nicotine cigarettes³². Cotinine levels in plasma could reach up to 500 ng/mL in heavy smokers. Since cotinine is completely cleared from the system after 3 days of smoke exposure, we quantified cotinine levels in plasma after 1, 2 and 3 days of treatment in low dose and high dose groups to check the exposure level to tobacco smoke (**Fig. 2**). The high dose group reaches the cotinine levels of a light active smoker (> 10 ng/mL) three days after starting smoke administration; while the low dose group displays a cotinine concentration lower than 5 ng/mL (**Fig. 2**). These cotinine values suggest that mice receiving low dose of cigarette smoke are uptaking a similar amount of smoke than passive smokers, whereas mice treated under the high dose of cigarette smoke receive a similar exposure as light active smokers.

Cigarette smoking exacerbates amyloid load and plaque density

Amyloid beta (A β) extracellular accumulation is one of the main neuropathological features of AD. To determine whether smoking affects A β deposition, we analyzed A β burden, density and size of amyloid deposits in 7 month-old control transgenic animals and those treated with different doses of cigarette smoke. We focused in the hippocampus and cortex because these regions are the most affected by amyloid deposition in AD in both humans and transgenic animals. Histological analysis of immunostained slides with a specific antibody against A β (4G8, which recognizes amino

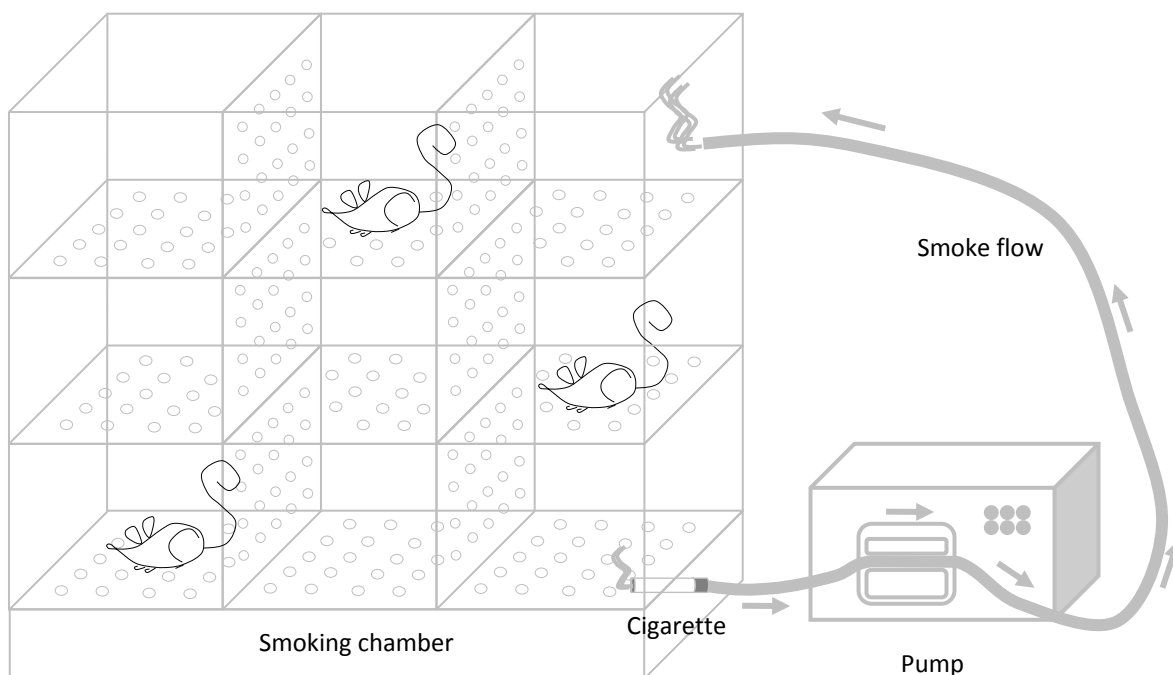


Figure 1. Diagram of the smoking chamber and smoke flow. A peristaltic pump was used to suck the smoke from the cigarette and redirected it into the chamber again. Both mainstream and sidestream smoke was input into the chamber. The smoking chamber has 9 compartments connected by holed panels. During the treatment, animals were rotated for a more homogeneous cigarette smoke exposure. No animals were placed on the compartments that directly received the smoke (either from the cigarette or from the pump). Control animals were exposed only to room air in a similar chamber.

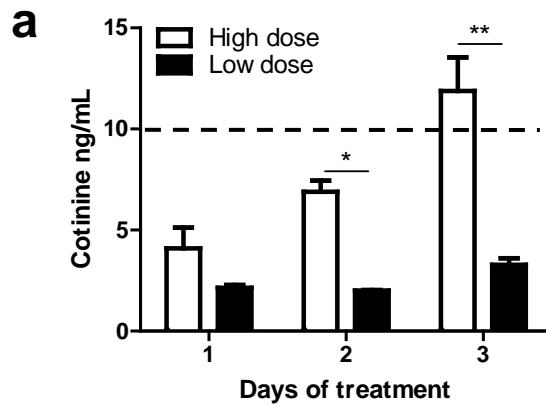


Figure 2. Mice exposed to high dose of cigarette smoke contain comparable amounts of cotinine in serum as light active smokers. The level of cotinine in blood provides a direct quantification of the nicotine intake and thus is a valuable indicator of tobacco smoke exposure³¹. Low dose treated animals showed a low cotinine blood level, which is in the range observed for passive smokers (lower than 10 ng/mL); while in high dose treated animals, cotinine blood levels were similar to light active smokers (more than 10 ng/mL). The significance of the differences was evaluated by two-way ANOVA, followed by individual comparison using Bonferroni post-test. Data shown as mean (\pm s.e.m.). $n=3$ animals/group; * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

acid residues 17-24 of A β) was performed in exposed and unexposed mice (**Fig. 3**). APP/PS1 animals start to develop amyloid plaques around 5-6 months-old^{33, 34}. At 7 months old, control animals and those exposed to a low dose of cigarette smoke, display a small amount of A β plaques in cortical (**Fig. 3a**) and hippocampal (**Fig. 3b**) regions. Quantification of A β burden, expressed as percentage of stained area per total area analyzed, showed a significant increase (>33%) in amyloid load in high dose treated animals compared with the low dose group or the control unexposed animals in the cerebral cortex (n=5-6 animals/group, 4 sections/animal; p=0.016 by one-way ANOVA; p<0.05 by post hoc Tukey's multiple comparisons test) (**Fig. 3c**). However, despite a trend, amyloid burden was not significantly increased in the hippocampal region by smoke exposure (**Fig. 3d**). The increase of amyloid load could be related with an increase in the number of plaques, the size of the amyloid deposits, or both. To address this question, we next quantified the density of amyloid plaques and expressed this measurement as a number of amyloid plaques per mm². In this case, we could find significant differences in plaque density in both cortex (**Fig. 3e**) and hippocampus (**Fig. 3f**) (+39.7% and +48.6% respectively). These results indicate that smoke exposure exacerbates the pathology by increasing the amount of amyloid plaques, possibly by promoting the formation of new plaques. To further investigate this issue, we studied the size distribution of amyloid deposits, classifying them into four different size ranges: plaques smaller than 200 μm^2 , between 200 and 500 μm^2 , 500-1000 μm^2 and bigger than 1000 μm^2 . In both cortex (**Fig. 3g**) and hippocampus (**Fig. 3h**), we observed a significant increase in the number of small plaques (+53.0% and +60.5% respectively) in high dose group compared with low dose and control groups (n=5-6 animals/group, 4 sections/animal; p=0.035 by two-way ANOVA; p<0.05 and p<0.01 by post hoc test, respectively). This result suggests that the primary effect of tobacco smoke on amyloid is to promote the formation of new A β deposits.

To evaluate the influence of smoking in the formation of fibrillar amyloid deposits, Thioflavin-S (ThS) staining was done in sections corresponding to the cortical area (**Fig. 4a**), hippocampus (**Fig. 4b**), and subiculum (**Fig. 4c**). Quantification of ThS-positive fibrillar amyloid shows that high dose treated animals display a larger amount of these structures in both cortex (+58.1%) and hippocampus (+103.0%) (**Fig. 4d,e**) compared with low dose treated animals and controls (n=5-6 animals/group, 4 sections/animal; p=0.021 and p=0.041 respectively by one-way ANOVA; p<0.05 by post hoc test). However, the ThS-positive amyloid burden in the subicular area was not significantly different among groups after smoke exposure (**Fig. 4f**), although a clear tendency was evident in the high dose smoke treated group compare with the untreated control. These results indicate that smoking can also enhance the maturation of amyloid plaques. Alternatively, it is also possible that smoking can stimulate the earlier deposition of plaques, giving them more time to mature. Therefore, exposure to high dose cigarette smoke induces an increase in the number, burden, and maturation of amyloid plaques in hippocampus and cortex. No significant effect on any of these parameters was observed when animals were subjected to low doses of cigarette smoke, comparable to those received by passive smokers.

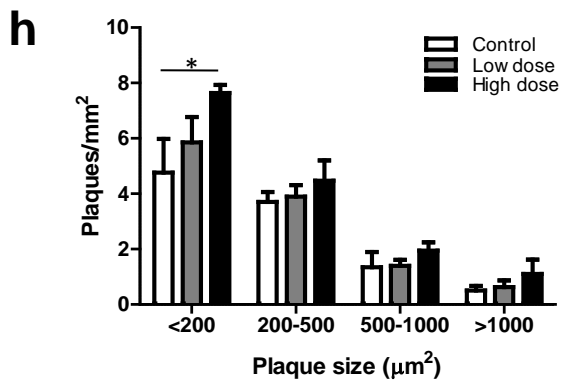
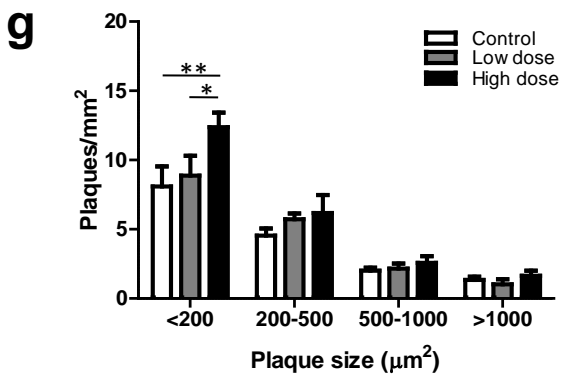
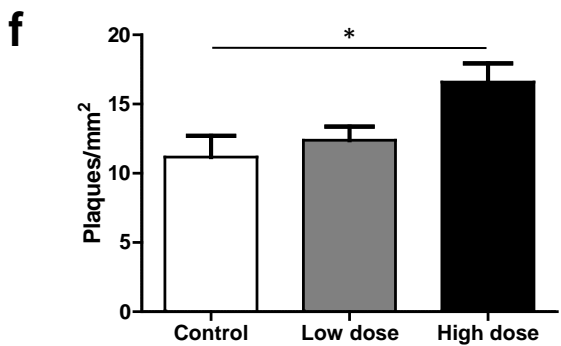
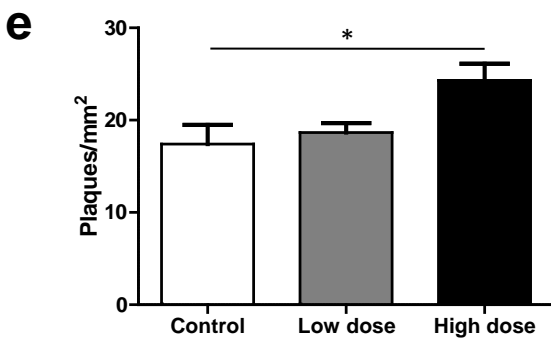
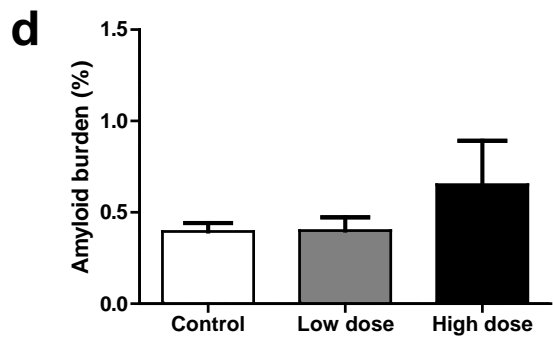
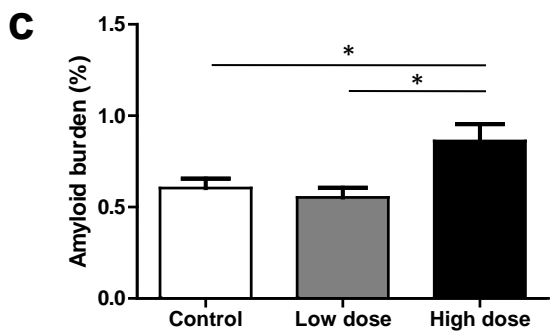
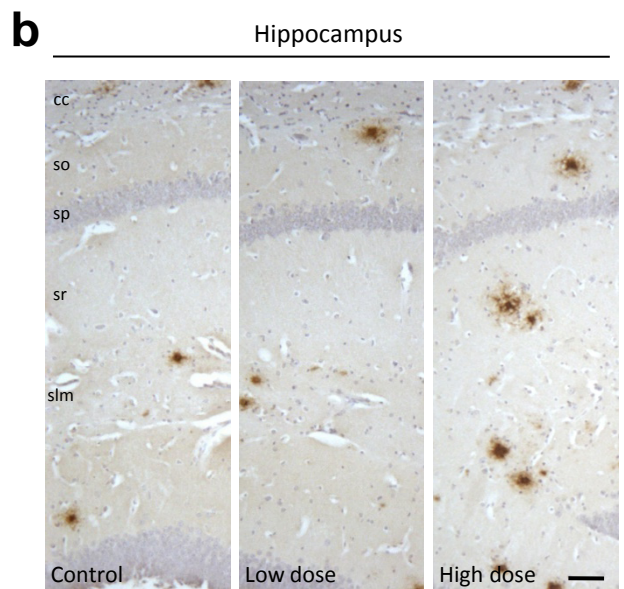
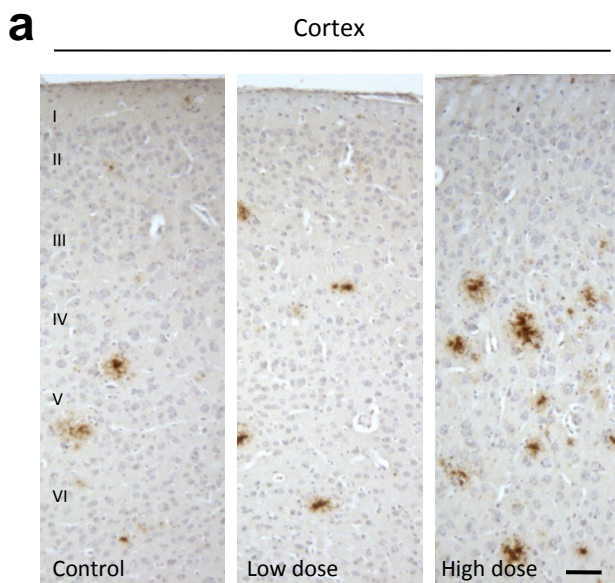


Figure 3. Smoking significantly increases A β load and amyloid plaque density in animals exposed to high dose cigarette smoke. Light microscopic images of 4G8-immunoreactivity counterstained with hematoxylin in cortex (**a**) and hippocampus (**b**) of control, low dose, and high dose cigarette smoke treated mice. Image analysis was done to estimate the amyloid burden in cortex (**c**) and hippocampus (**d**), which is expressed as the percentage of the area reactive with anti-A β antibody in relation to the total area analyzed. The amyloid plaque density (number of plaques per area) was also calculated in both cortex (**e**) and hippocampus (**f**). The size distribution of plaques in cortex (**g**) and hippocampus (**h**) was determined to investigate whether smoke exposure has a differential effect on plaque formation or growth. I-VI: cortical layers; cc: corpus callosum; so: stratum oriens; sp: stratum pyramidale; sr: stratum radiatum; slm: stratum lacunosum moleculare. Data (mean \pm s.e.m.) was analyzed by one-way (c-f) or two-way (g-h) ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons post-test. Significance (* p <0.05; ** p <0.01) was indicated in the figure. n=5-6 animals/group, 4 sections/animal. Scale bar: 50 μ m.

Enhancement of neuroinflammation by cigarette smoking

Another important hallmark of AD pathology is a chronic inflammatory response in the brain associated with amyloid deposition. This neuroinflammatory process manifests as an increase of reactive astrocytes and activated microglia³⁵. To determine the effect of cigarette smoke in AD-associated microglial activation, we immunostained microglial cells using Iba1 antibody (**Fig. 5a-d**) and quantified the labeled area in relation to the total area analyzed. Iba1 is a protein specifically expressed in microglial cells with macrophage activity and is upregulated during their activation³⁶. As noticed in the representative pictures, both cortex (**Fig. 5a**) and hippocampus (**Fig. 5b**) display lower Iba1-immunoreactivity in control animals and low dose treated animals compared with the high dose group. Activated microglial cells in the control group (arrow in **Fig. 5c**) are scattered and less abundant than in the high-dose group, where enlargement of the cell body and swelling of microglial processes is highly prominent (arrows in **Fig. 5d**). Most of the microglial cells are arranged in clusters, probably surrounding the plaques. The densitometric analysis of light microscopic images showed an enhanced microglial activation in high dose treated animals compared with low dose and control groups in both cortex (+50.0%) and hippocampus (+85.7%) (n=5-6 animals/group, 4 sections/animal; p=0.032 and p=0.028 respectively by one-way ANOVA; p<0.05 by post hoc test) (**Fig. 5e,f**). To evaluate whether microglial activation was due to amyloid deposition, we analyzed the correlation between microglial and amyloid staining in all the studied groups. The Pearson correlation coefficient value was 0.72 (p<0.0001), indicating a significant positive correlation between amyloid burden and microglial activation.

We also wanted to determine the effect of cigarette smoke exposure in astrogliosis. Astroglial cells were immunostained using GFAP-antibody (**Fig. 6a-d**), which recognizes an intermediate filament protein (glial fibrillary acidic protein) expressed mainly in astrocytes. GFAP immunostaining was highly increased in the high dose exposed group compared with the control and low dose groups, as shown in representative pictures of the cortical (**Fig. 6a**) and hippocampal (**Fig. 6b**) areas. Higher magnification of reactive astrocytes in the cortex is shown in the control (**Fig. 6c**) and high dose group (**Fig. 6d**). Numerous reactive astrocytes with cell body hypertrophy and thickened processes were seen in the high dose treated group (arrows in **Fig. 6d**) compared with the control group. Results of densitometric analysis showed a significant increase in the area occupied by reactive astrocytes in cortex (+105.0%) and hippocampus (+71.1%) of high dose treated animals compared to low dose and control animals (**Fig. 6e,f**) (n=5-6 animals/group, 4 sections/animal; p=0.014 and p=0.009 respectively by one-way ANOVA; p<0.05 by post hoc tests). The correlation between astroglial immunostaining and amyloid deposition was determined by linear regression. The Pearson correlation coefficient value was 0.67 (p<0.0001), indicating a significant positive correlation between the two variables including all studied groups. These results indicate that animals exposed to high doses of tobacco smoke exhibit a higher inflammatory response in hippocampus and cortex, and that this neuroinflammatory process is likely the result of higher amyloid deposition induced by smoking.

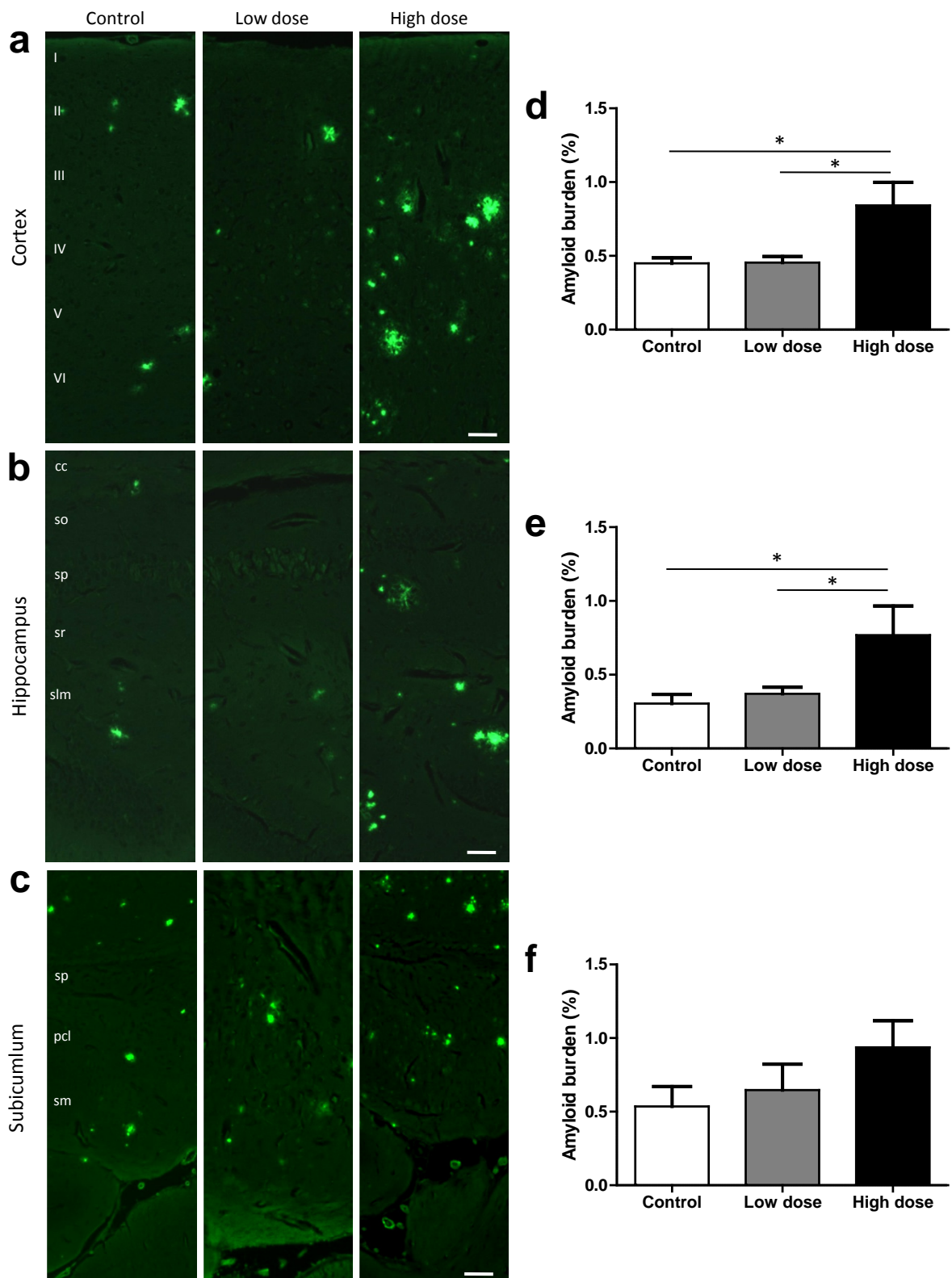


Figure 4. Fibrillar A load is significantly increased in high dose smoking treated animals. Epifluorescent microscopic images of ThS staining shown in cortex (a), hippocampus (b), and subiculum (c) of control, low dose, and high dose cigarette smoke treated mice. The burden of ThS-positive amyloid plaques was increased in high dose treated mice in both cortical areas (d) and hippocampus (e) compared to control and low dose age-matched mice. However, no significant changes were observed in the subicular area (f). I-VI: cortical layers; cc: corpus callosum; so: stratum oriens; sp: stratum pyramidale; sr: stratum radiatum; slm: stratum lacunosum molecular; sm: stratum polymorphic; pcl: pyramidal cell layer; sm: stratum moleculare. Data (mean \pm s.e.m.) was analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test (n=5-6 animals/group, 4 sections/animal). Scale bar: 50 μ m. *p<0.05

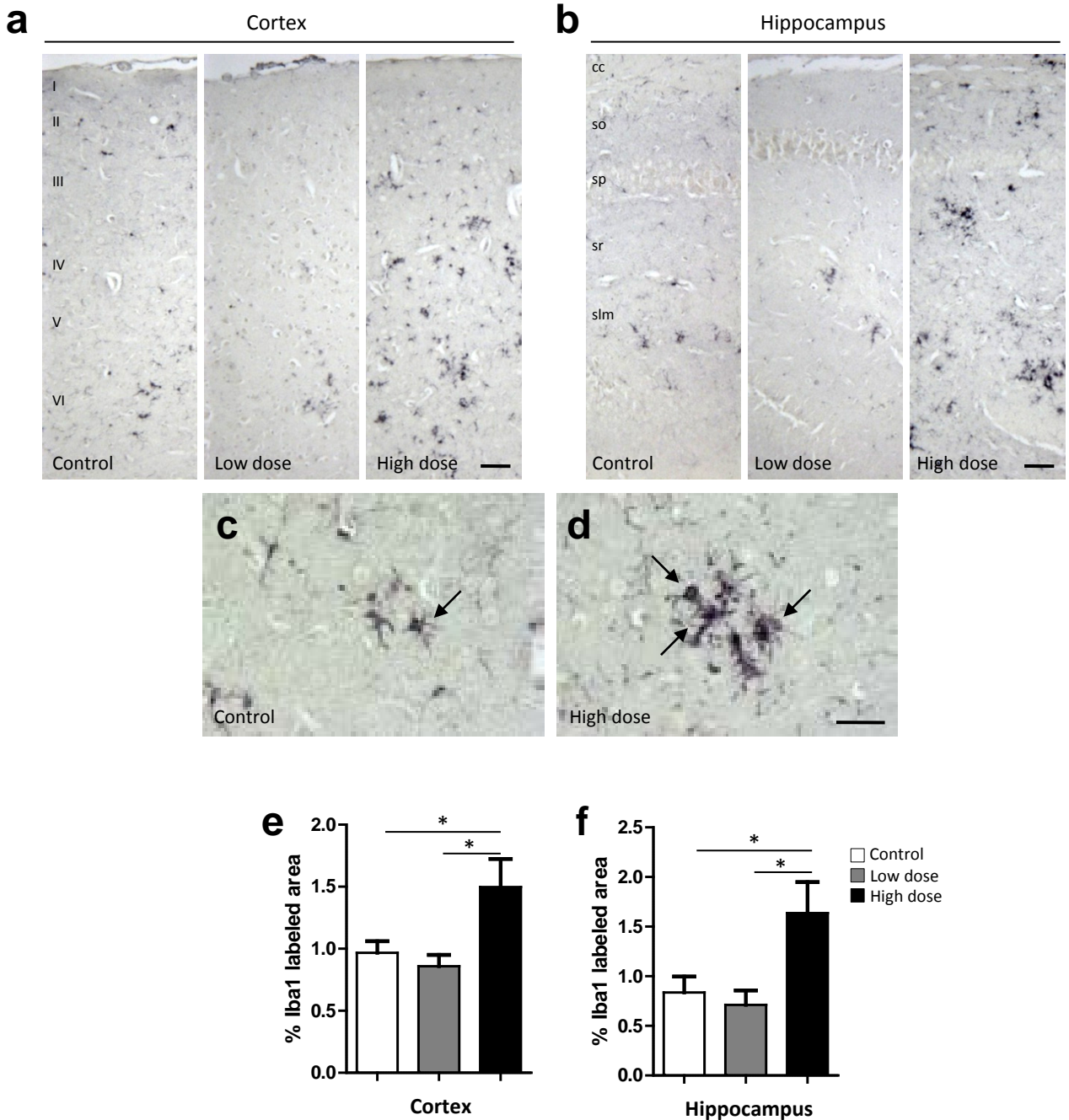


Figure 5. Microglial activation is significantly increased in high dose smoking treated animals. Light microscopic images of Iba1-immunoreactivity (specific for microglial cells) shown in cortex (a) and hippocampus (b) of control, low dose, and high dose cigarette smoke treated mice. Higher magnification images of Iba1-staining show the increased number of hypertrophied activated microglial cells (arrows in d) that appear in the cortex of the high dose-treated animals compared with the control group (c). Activated microglial cells were statistically increased in high dose-treated mice in both cortical (e) and hippocampal (f) areas compared to low dose and untreated age-matched mice. I-VI: cortical layers; cc: corpus callosum; so: stratum oriens; sp: stratum pyramidale; sr: stratum radiatum; slm: stratum lacunosum moleculare. Data (mean \pm s.e.m.) was analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. $n=5-6$ animals/group, 4 sections/animal. Scale bar: 50 μm (a-b), 25 μm (c-d). * $p<0.05$.

Tau phosphorylation is increased in smoke treated animals

It is well known that the presence of amyloid deposits produces an increase in cellular oxidative stress, which leads to a deregulation in the activity of serine/threonine kinases, among others³⁷. These kinases are involved in tau phosphorylation, inducing its hyperphosphorylation, which presumably leads to tangle formation³⁸. To determine whether smoke exposure modulates tau phosphorylation, we analyzed tau hyperphosphorylation by using a phospho-specific anti-tau antibody, AT8 (red staining), which recognizes phosphorylation in Ser-202 and Thr-205 (ref³⁹), co-stained with ThS to label amyloid plaques (in green) (**Fig. 7**). Representative pictures of cortical plaques are shown. Whereas in non-treated animals, no significant AT8-positive staining was found (**Fig. 7a**); small punctuated AT8-positive staining, similar to dystrophic neurites, appear in the low and high dose group both in cortex and hippocampal areas, mainly surrounding amyloid plaques (**Fig. 7b,c**). While the low dose group demonstrated very little AT8-immunoreactivity (arrow in **Fig. 7b2**), AT8-positive staining was evident in high dose-treated animals, exhibiting tau hyperphosphorylation surrounding most of the amyloid plaques (arrows in **Fig. 7c2**). At this point we cannot determine if this increase in tau phosphorylation is due to a direct effect of smoking treatment or due to the higher amount of amyloid plaques. It is important to highlight that the observed tau alterations are far from the neuritic tau pathology seen in AD brain. However, it is widely known in the field that bona-fide tau pathology is not seen in mice, unless animals express human mutant tau.

Neurodegeneration is not affected by cigarette smoke

Neuronal death is a common feature during aging and in neurodegenerative diseases, such as AD. Several transgenic models of AD recapitulate some of the neuropathological alterations observed in AD patients, but they scarcely show any evidence of neuronal death⁴⁰. To evaluate whether neurodegeneration is also enhanced by exposure to cigarette smoke, we analyzed neuronal loss by quantifying the number of neurons in cortex, hippocampus, and subiculum after staining with NeuN antibody, which recognizes a neuron-specific protein in mature neurons (**Fig. 8a-c**). No significant differences were found in neuronal density among the three groups in the cortical area (**Fig. 8d**), CA1-CA3 hippocampal areas (**Fig. 8e**), or subiculum (**Fig. 8f**). The lack of differences in neurodegeneration among the groups was also confirmed by Fluoro-Jade C staining, which labels specifically degenerating neurons (data not shown). Nevertheless, it is still possible that some particular subsets of neurons could be specifically vulnerable to cigarette smoke exposure.

Discussion

Sporadic, late-onset AD is the most common form of the disease, which is likely associated to a complex set of environmental and genetic risk factors. Based on epidemiological studies and *in vitro* and *in vivo* experiments with nicotine administration, it was initially proposed that smoking might be protective against AD^{6,7,12-14}. However, more recent and complete demographic studies

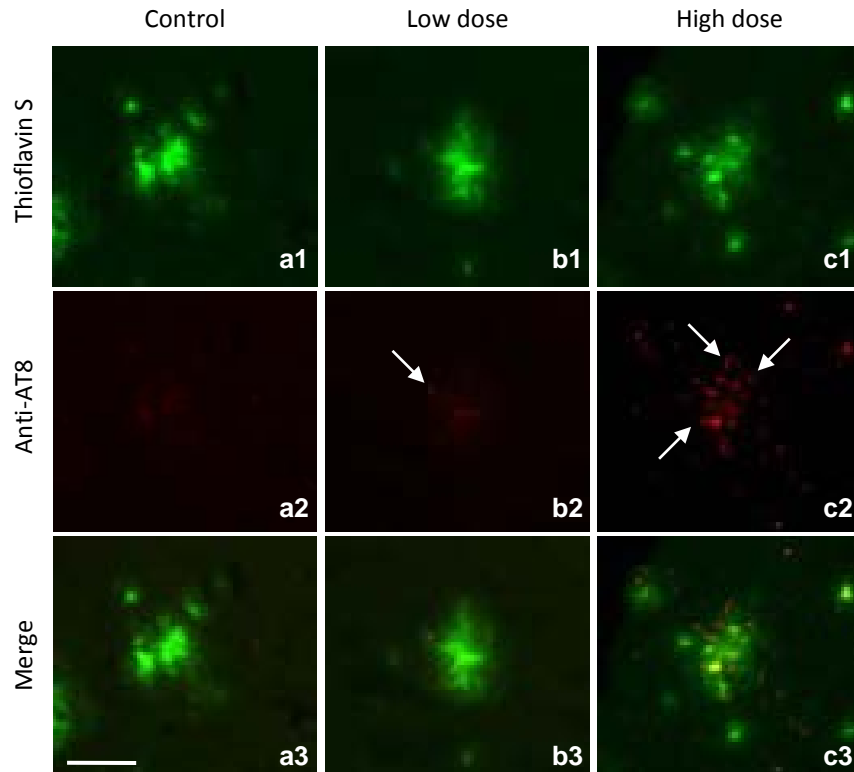


Figure 7. Abnormally phosphorylated tau is enhanced in smoke treated animals. Representative epifluorescent microscopic images of ThS staining (green) and anti-AT8 phosphorylated tau antibody (red) seen in control (a), low dose (b), and high dose (c) cigarette smoke treated mice in the motor cortex. High dose smoking induces tau hyperphosphorylation (arrows in c2) compared to control and low dose age-matched mice, in which little or no AT8-positive staining was found. Abnormally phosphorylated tau accumulates mainly around amyloid plaques (c3). Scale bar: 25 μ m.

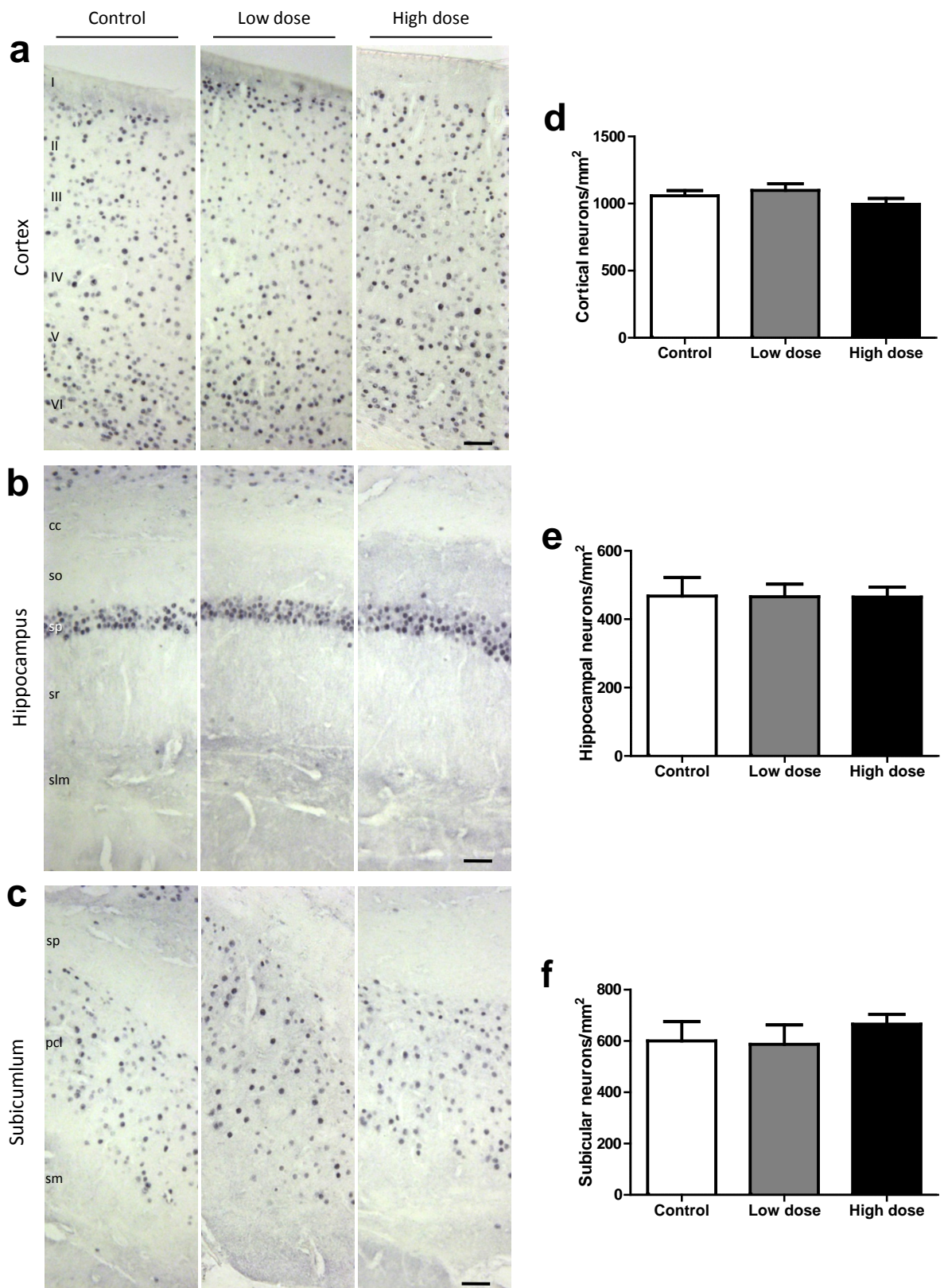


Figure 8. Neurodegeneration is not modified by smoking exposure. Neuronal density (number of neurons per mm²) was estimated by quantifying the number of neurons after NeuN staining (a-c). Neuronal density is similar in control and smoke exposed animals ($p > 0.5$) in cortical region (d), CA1-CA3 hippocampal areas (e), and subiculum (f) positing that cigarette smoke does not increase the rate of neuronal death. I-VI: cortical layers; so: stratum oriens; sp: stratum pyramidale; sr: stratum radiatum; sm: stratum polymorphic; pcl: pyramidal cell layer; sm: stratum moleculare. Data (mean \pm s.e.m.) was analyzed by one-way ANOVA test. $n = 5-6$ animals/group. Scale bar: 50 μ m.

have shown that smoking represents one of the largest risk factors for AD^{3,19-22}. To study the effect of cigarette smoking on the onset of brain alterations typical of AD, we exposed mice, genetically engineered to develop some of the neuropathological features of AD, to complete tobacco smoke, under similar conditions in which smokers are exposed to this material. Double transgenic APP/PS1 mice expressing two of the human genes associated to AD were exposed to different doses of cigarette smoke, five days per week, during four consecutive months. Pathological features of AD were measured and compared with the untreated control counterparts. Our results suggest that smoking increases amyloid deposition in a dose-dependent manner, by promoting the formation of new plaques and contributing to the maturation of amyloid deposits. Smoking also exacerbates gliosis, inducing microglial activation and reactive astrogliosis in the mice exposed to high doses of smoke. Neuroinflammatory response was exacerbated after smoke exposure and correlated with the increase of amyloid lesions. Exposure to smoke also induced alterations on tau phosphorylation around the amyloid plaques, which are considered a precursor of tangle formation. However, we could not find a decrease in neuronal density in smoke-exposed animals. Our findings provide direct evidence that cigarette smoking exacerbates some of the typical neuropathological alterations associated to AD *in vivo*. The mechanisms by which smoking increases the risk of AD abnormalities remain unclear. There are several possible pathways by which smoking may have this deleterious effect, including direct induction of protein misfolding and aggregation due to some of the smoking components, increase of oxidative stress, impairments of the proteostasis machinery, cerebrovascular damage, brain inflammation, etc. Further studies are needed to elucidate which of these different mechanisms operate and whether the same effect is also observed in humans. Our results suggest that cigarette smoking may contribute to the accumulation of cerebral protein aggregates and, thus, may constitute an important environmental risk factor for AD and other protein misfolding diseases.

References

1. Querfurth, H.W. & LaFerla, F.M. Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **362**, 329-344 (2010).
2. Holtzman, D.M., Goate, A., Kelly, J., & Sperling, R. Mapping the road forward in Alzheimer's disease. *Sci. Transl. Med.* **3**, 114ps48 (2011).
3. Barnes, D.E. & Yaffe, K. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol.* **10**, 819-828 (2011).
4. Flicker, L. Modifiable lifestyle risk factors for Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* **20**, 803-811 (2010).
5. Lindsay, J. *et al.* Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *Am. J. Epidemiol.* **156**, 445-453 (2002).
6. Brenner, D.E. *et al.* Relationship between cigarette smoking and Alzheimer's disease in a population-based case-control study. *Neurology* **43**, 293-300 (1993).
7. Lee, P.N. Smoking and Alzheimer's disease: a review of the epidemiological evidence. *Neuroepidemiology* **13**, 131-144 (1994).

8. Jones,G.M., Sahakian,B.J., Levy,R., Warburton,D.M., & Gray,J.A. Effects of acute subcutaneous nicotine on attention, information processing and short-term memory in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology (Berl)* **108**, 485-494 (1992).
9. Newhouse,P.A., Potter,A., & Levin,E.D. Nicotinic system involvement in Alzheimer's and Parkinson's diseases. Implications for therapeutics. *Drugs Aging* **11**, 206-228 (1997).
10. Utsuki,T. *et al.* Nicotine lowers the secretion of the Alzheimer's amyloid beta-protein precursor that contains amyloid beta-peptide in rat. *J. Alzheimers. Dis.* **4**, 405-415 (2002).
11. Lahiri,D.K. *et al.* Nicotine reduces the secretion of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein containing beta-amyloid peptide in the rat without altering synaptic proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **965**, 364-372 (2002).
12. Salomon,A.R., Marcinowski,K.J., Friedland,R.P., & Zagorski,M.G. Nicotine inhibits amyloid formation by the beta-peptide. *Biochemistry* **35**, 13568-13578 (1996).
13. Dickerson,T.J. & Janda,K.D. A previously undescribed chemical link between smoking and metabolic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 15084-15088 (2002).
14. Nordberg,A. *et al.* Chronic nicotine treatment reduces beta-amyloidosis in the brain of a mouse model of Alzheimer's disease (APPsw). *J. Neurochem.* **81**, 655-658 (2002).
15. Srivareerat,M., Tran,T.T., Salim,S., Aleisa,A.M., & Alkadhi,K.A. Chronic nicotine restores normal Abeta levels and prevents short-term memory and E-LTP impairment in Abeta rat model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **32**, 834-844 (2011).
16. Echeverria,V. *et al.* Cotinine reduces amyloid-beta aggregation and improves memory in Alzheimer's disease mice. *J. Alzheimers. Dis.* **24**, 817-835 (2011).
17. Hellstrom-Lindahl,E., Mousavi,M., Ravid,R., & Nordberg,A. Reduced levels of Abeta 40 and Abeta 42 in brains of smoking controls and Alzheimer's patients. *Neurobiol. Dis.* **15**, 351-360 (2004).
18. Ott,A. *et al.* Smoking and risk of dementia and Alzheimer's disease in a population-based cohort study: the Rotterdam Study. *Lancet* **351**, 1840-1843 (1998).
19. Reitz,C., den,H.T., van,D.C., Hofman,A., & Breteler,M.M. Relation between smoking and risk of dementia and Alzheimer disease: the Rotterdam Study. *Neurology* **69**, 998-1005 (2007).
20. Anstey,K.J., von,S.C., Salim,A., & O'Kearney,R. Smoking as a risk factor for dementia and cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies. *Am. J. Epidemiol.* **166**, 367-378 (2007).
21. Cataldo,J.K., Prochaska,J.J., & Glantz,S.A. Cigarette smoking is a risk factor for Alzheimer's Disease: an analysis controlling for tobacco industry affiliation. *J. Alzheimers. Dis.* **19**, 465-480 (2010).
22. Ulrich,J., Johansson-Locher,G., Seiler,W.O., & Stahelin,H.B. Does smoking protect from Alzheimer's disease? Alzheimer-type changes in 301 unselected brains from patients with known smoking history. *Acta Neuropathol.* **94**, 450-454 (1997).
23. Tyas,S.L. *et al.* Mid-life smoking and late-life dementia: the Honolulu-Asia Aging Study. *Neurobiol. Aging* **24**, 589-596 (2003).
24. Riggs,J.E. Smoking and Alzheimer's disease: protective effect or differential survival bias? *Lancet* **342**, 793-794 (1993).
25. Sabbagh,M.N. *et al.* Smoking affects the phenotype of Alzheimer disease. *Neurology* **64**, 1301-1303 (2005).
26. Oddo,S. *et al.* Chronic nicotine administration exacerbates tau pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 3046-3051 (2005).
27. Juan,D. *et al.* A 2-year follow-up study of cigarette smoking and risk of dementia. *Eur. J. Neurol.* **11**, 277-282 (2004).

28. Richards,M., Jarvis,M.J., Thompson,N., & Wadsworth,M.E. Cigarette smoking and cognitive decline in midlife: evidence from a prospective birth cohort study. *Am. J. Public Health* **93**, 994-998 (2003).
29. Almeida,O.P. *et al.* Smoking is associated with reduced cortical regional gray matter density in brain regions associated with incipient Alzheimer disease. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* **16**, 92-98 (2008).
30. Benowitz,N.L. Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol. Rev.* **18**, 188-204 (1996).
31. Seccareccia,F. *et al.* Serum cotinine as a marker of environmental tobacco smoke exposure in epidemiological studies: the experience of the MATISS project. *Eur. J. Epidemiol.* **18**, 487-492 (2003).
32. Breu-Villaca,Y. *et al.* Exposure to tobacco smoke containing either high or low levels of nicotine during adolescence: differential effects on choline uptake in the cerebral cortex and hippocampus. *Nicotine. Tob. Res.* **12**, 776-780 (2010).
33. Jankowsky,J.L. *et al.* Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomol. Eng* **17**, 157-165 (2001).
34. Garcia-Alloza,M. *et al.* Characterization of amyloid deposition in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol. Dis.* **24**, 516-524 (2006).
35. Tuppo,E.E. & Arias,H.R. The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 289-305 (2005).
36. Leone,C. *et al.* Characterization of human monocyte-derived microglia-like cells. *Glia* **54**, 183-192 (2006).
37. Hernandez,F. & Avila,J. The role of glycogen synthase kinase 3 in the early stages of Alzheimers' disease. *FEBS Lett.* **582**, 3848-3854 (2008).
38. Takashima,A. GSK-3 is essential in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* **9**, 309-317 (2006).
39. Goedert,M., Jakes,R., & Vanmechelen,E. Monoclonal antibody AT8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205. *Neurosci. Lett.* **189**, 167-169 (1995).
40. Games,D., Buttini,M., Kobayashi,D., Schenk,D., & Seubert,P. Mice as models: transgenic approaches and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* **9**, 133-149 (2006).

4. *Discusión*



En el presente trabajo de Tesis Doctoral se ha caracterizado en primer lugar la patología asociada a tau y la patología amiloide en el hipocampo y giro parahipocampal de muestras humanas *post mortem* clasificadas según los estadios de Braak. Posteriormente, se ha analizado en estas mismas regiones, la respuesta inflamatoria y el posible papel de las células gliales activadas en la progresión de la enfermedad, así como la vulnerabilidad que presentan determinadas poblaciones de interneuronas a lo largo del proceso neurodegenerativo. Además, se han caracterizado el hipocampo y la corteza perirrinal del modelo transgénico APP_{751SL}/PS1_{M146L} para comparar y validar los resultados con los obtenidos en las muestras de pacientes de Alzheimer. Por último, se ha estudiado el efecto del humo del tabaco sobre la progresión de la patología en un modelo APP/PS1.

Las aportaciones científicas más relevantes derivadas de este trabajo se detallan a continuación:

- 1. El hipocampo y giro parahipocampal de las muestra humanas analizadas presentan un patrón regional y temporal de las lesiones neurofibrilares asociadas a fosfo-tau característico de los diferentes estadios de Braak.*
 - La patología de tau, analizada mediante inmunohistoquímica con el anticuerpo AT8, se origina en la región CA1/CA2 del hipocampo propio y en las cortezas perirrinal y entorrinal del giro parahipocampal (Braak II); posteriormente, se propaga por toda la formación hipocampal afectando también al subículo y al giro dentado y por las capas III y V de todo el giro parahipocampal, en los individuos de estadio moderado (Braak III-IV); y finalmente, se extiende por todas las capas del hipocampo y giro parahipocampal agregándose fosfo-tau tanto en los somas como en los procesos dendríticos y axonales en los individuos en fases avanzadas (Braak V-VI).
 - Las formas fosforiladas de monómeros de tau, cuantificadas por *Western blot*, tanto en la fracción total de proteínas como en la fracción S1 soluble hipocampal, se acumulan preferentemente en los individuos dementes Braak V-VI.
- 2. La acumulación de Aβ extracelular es menos acusada que la patología tau y además exhibe una gran variabilidad regional e interindividual en las muestras humanas a lo largo de los estadios de Braak. Por el contrario, en el modelo APP/PS1 la patología amiloide es muy severa y sigue un patrón espacio temporal específico.*
 - El giro parahipocampal humano se encuentra ya profundamente afectado por la patología amiloide en las muestras de estadios iniciales de la patología tau (Braak II), mientras que la acumulación de Aβ en el hipocampo sucede en fases más avanzadas siguiendo un patrón definido. Los primeros depósitos amiloides se observan en los casos Braak III-IV en la región CA1, subículo y la capa molecular del giro dentado, mientras que el hilio solo se encuentra afectado en las muestras de individuos dementes Braak V-VI.
 - La acumulación del Aβ en el hipocampo, además, presenta una distribución espacial laminar que coincide con las conexiones axonales procedentes de la corteza entorrinal (correspondientes con la vía alvelar y la vía perforante).

- El tipo de placa amiloide que se desarrolla en los pacientes de Alzheimer es dependiente de región. Los depósitos fibrilares y neuríticos se observan en el giro dentado, las placas clásicas en CA1 y en el giro parahipocampal, mientras que los depósitos difusos únicamente se detectaron en la corteza del giro parahipocampal.
 - El hipocampo del modelo transgénico APP/PS1 presenta una patología amiloide mucho más severa que las muestras humanas, acumulando una gran cantidad de monómeros y oligómeros de A β con la edad. Además, al contrario que ocurre en los pacientes, las primeras placas se forman a edades muy tempranas en la formación hipocampal. Más aún, las placas amiloides de estos ratones transgénicos son siempre fibrilares y de naturaleza neurítica, presentando una morfología y composición similar con independencia de la región analizada.
3. *En el hipocampo y giro parahipocampal humano existe una limitada activación microglial asociada a las placas durante la progresión de la patología, y lo que es más relevante, tiene lugar un proceso degenerativo muy significativo de las células microgliales. Por el contrario, en los animales transgénicos APP/PS1 tiene lugar una exacerbada activación microglial que aumenta gradualmente con el avance de la patología amiloide.*
- Las células microgliales que rodean a las placas neuríticas de pacientes exhiben moderados cambios morfológicos típicos del proceso de activación y presentan un fenotipo Iba1+/CD68+/CD45+/P2ry12-. La microglía interplaca muestra una morfología quiescente y un fenotipo Iba+/CD68-/CD45-/P2ry12+.
 - La microglía que rodea e infiltra las placas amiloides presenta A β intracelular sugiriendo un posible papel fagocítico y/o en la formación/compactación del amiloide.
 - Se produce una escasa infiltración de macrófagos y linfocitos en los pacientes de Alzheimer. Las células microgliales parcialmente activadas, que rodean a las placas, no presentan un origen periférico.
 - La microglía del hipocampo y giro parahipocampal de pacientes Braak V-VI sufre un grave proceso degenerativo caracterizado por una disminución significativa del área ocupada por estas células gliales y por la presencia de rasgos morfológicos patológicos (atrofia y fragmentación). Este fenotipo senescente/degenerativo se detecta tanto por la población general de microglía Iba1-positiva (en el giro dentado y en la región CA3), como por las células microgliales que se sitúan en las regiones interplaca P2ry12-positivas (en todas las regiones analizadas).
 - Al contrario de lo observado en los pacientes de Alzheimer, la respuesta microglial de los ratones transgénicos APP/PS1 se caracteriza por una extensa activación con patentes cambios morfológicos desde edades tempranas, tanto alrededor de los depósitos extracelulares como en regiones interplaca, y que incrementa gradualmente con la edad, mostrando un fenotipo M1 proinflamatorio productor de TNF α . Además, se produce una

- elevada infiltración de linfocitos T en hipocampo y corteza entorrinal en comparación con los pacientes Braak V-VI.
- Las formas fosforiladas de tau, y no el A β , presentes en las fracciones solubles S1 de hipocampo de pacientes de Alzheimer son tóxicas para la microglía *in vitro* e inocuas para la población de astrocitos en cultivo. En contraste, la fracción soluble de hipocampo de ratones APP/PS1 no tiene ningún efecto tóxico sobre las células gliales.
 - Al contrario de lo que sucede con la microglía, la población astrogliar del hipocampo y giro parahipocampal de las muestras humanas Braak V-VI presentan una elevada reactividad asociada a las placas de A β , de manera similar a lo observado en los ratones APP/PS1, y, a diferencia de lo esperado, con un fenotipo productor de la citoquina proinflamatoria TNF α .
4. *El proceso neurodegenerativo que tiene lugar en el hipocampo y giro parahipocampal de los pacientes de Alzheimer afecta significativamente a las poblaciones de interneuronas que expresan SOM y a las que producen PV. Sin embargo, en el modelo APP/PS1 esta vulnerabilidad neuronal es selectiva, afectando gravemente a las neuronas SOM-positivas, mientras que las que expresan PV son resistentes a la evolución de la patología.*
- La población de interneuronas SOM-positivas de los casos dementes Braak V-VI sufre una disminución muy notable en el giro dentado y en la corteza perirrinal del giro parahipocampal, además de una reducción generalizada del plexo axonal positivo para SOM en todas las regiones estudiadas. La presencia de numerosas distrofias SOM-positivas, asociadas a las placas de A β , es una característica patológica del giro dentado de todas las muestras Braak V-VI.
 - En los enfermos de Alzheimer, y a diferencia de los modelos animales, existe una reducción significativa de la densidad neuronal de la población que expresa PV, así como una reducción de los plexos axonales PV-positivos.
 - En la corteza perirrinal del modelo APP/PS1 existe una pérdida significativa de interneuronas SOM-positivas en las capas profundas en paralelo a la acumulación de A β extracelular, sin embargo la población que expresa PV permanece estable con el curso de la enfermedad. Estudios *in vitro* demuestran la resistencia de las células PV-positivas a los agentes tóxicos (mayoritariamente A β) presentes en la fracción soluble S1 de los modelos transgénicos.
5. *La exposición al humo del tabaco agrava las lesiones neuropatológicas que desarrollan los ratones APP/PS1 en el hipocampo y corteza cerebral, incrementando la carga amiloide, la fosforilación de tau y el proceso de respuesta inflamatoria microglial y astrogliar.* Estos datos sugieren que el consumo de tabaco podría constituir un importante factor de riesgo ambiental para la enfermedad de Alzheimer.

A continuación, se discuten los principales resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral.

Limitaciones del estudio

En el desarrollo del presente trabajo se han detectado una serie de limitaciones asociadas con el uso de las muestras humanas *post mortem*. Por un lado, se ha puesto de manifiesto la existencia de una gran variabilidad inter-individual por lo que tal vez hubiese sido necesario disponer un mayor número de muestras para analizar para cada uno de los estadios. Sin embargo, la aproximación experimental utilizada principalmente en nuestro estudio (técnicas inmunohistoquímicas en secciones de tejido) implicaba un abordaje metodológico complejo por el uso simultáneo en cada experimento de múltiples secciones de los distintos individuos para poder hacer estudios cuantitativos, hecho que limitaba el uso de muchas muestras de forma conjunta. El tamaño de la muestra en sí era otra limitación, ya que en una gran mayoría de los casos se realizaron cortes gruesos (30 μm) para su uso en incubación *free-floating* que permite obtener una mayor calidad de inmunotinción (en comparación con las muestras incluidas en parafina), y por tanto el número de secciones final para cada caso fue reducido. Esto limitó la realización de algunos estudios más sistemáticos en todas las muestras al no disponer de suficientes secciones, por lo que nos centramos en determinados marcadores de interés.

La limitación más importante de este estudio ha sido sin duda alguna carecer de información sobre el historial clínico de cada paciente. La única información disponible a partir de los Biobancos de origen fue el estadio de Braak, el tiempo *post mortem* y la existencia o no de demencia, de tal forma que en las muestras utilizadas todos los individuos diagnosticados como Braak II, III y IV estaban catalogados como no dementes, mientras que aquellos clasificados como Braak V y VI presentaban un cuadro de demencia. La posible existencia de otras patologías tanto en los pacientes como en los controles usados, como por ejemplo diabetes, hipercolesterolemia, enfermedad cerebrovascular, etc., o incluso los tratamientos farmacológicos a los que estuvieran sometidos los individuos podría ser, en parte, responsable de la heterogeneidad de los datos. Por otra parte, conocer el genotipo del paciente también hubiese sido importante debido al gran número de genes asociados al desarrollo de esta enfermedad, en especial APOE, factor de riesgo en la aparición de Alzheimer esporádico. Consideramos que hubiese sido fundamental conocer los tiempos de progresión de la enfermedad (edad de diagnóstico, años de evolución de la enfermedad, etc.), los datos del examen del estado mental (MMSE; *Mini-Mental State Examination*; GDS, *Global Deterioration Scale*), y la clasificación en la escala de demencia clínica (CDR; *Clinical Dementia Rating*).

Disponer de toda esta información relativa a los pacientes nos hubiera permitido interpretar, agrupar o evaluar con mayor precisión los resultados obtenidos, especialmente en aquellos casos en los que los datos son muy heterogéneos dentro de un mismo grupo, y nos hubiera permitido, tras evaluar y correlacionar varios parámetros, clasificar mejor los grupos de pacientes. Por tanto, no ha sido posible establecer ninguna correlación entre la patología observada (a nivel molecular/celular), la duración de la enfermedad y los déficits cognitivos.

4.1. LA PATOLOGÍA ASOCIADA A FOSFO-TAU ES MÁS PROMINENTE QUE LA PATOLOGÍA $A\beta$ EN EL HIPOCAMPO Y GIRO PARAHIPOCAMPAL HUMANO

4.1.1. Las lesiones neurofibrilares asociadas a fosfo-tau progresan según el patrón espacio-temporal topográfico característico de los estadios de Braak

La enfermedad de Alzheimer es una tauopatía, que se caracteriza por desarrollar lesiones neurofibrilares degenerativas provocadas por la agregación fibrilar de la proteína tau hiperfosforilada (revisado en Nelson et al. 2009; Castellani et al. 2010; Serrano-Pozo et al. 2011; Takashima 2013; Medina y Avila 2014). Otras tauopatías relacionadas con la demencia son la demencia frontotemporal, la enfermedad de Pick o la degeneración corticobasal, por lo que la disfunción en la proteína tau se encuentra inequívocamente asociada a los procesos neurodegenerativos (Gendron y Petrucelli 2009). Tau es una proteína de unión a microtúbulos (MAP), concentrada fundamentalmente en el axón, y que en condiciones fisiológicas regula el ensamblaje, la dinámica y organización espacial de los microtúbulos, y por tanto está implicada en la regulación del transporte axonal de orgánulos. La fosforilación de tau provoca que se disocie de los microtúbulos y se agregue intracelularmente en el compartimento somatodendrítico formando los ovillos neurofibrilares o NFTs (Grundke-Iqbal et al. 1986), desestabilizando y comprometiendo de esta manera toda la red microtubular, neurítica y sináptica (revisado en Crimins et al., 2013). Los diferentes cambios neurofibrilares asociados a la patología de tau (NFTs en los cuerpos neuronales, y filamentos de neuropilo y neuritas distróficas en las prolongaciones neuríticas) no se distribuyen de manera aleatoria sino que siguen un patrón espacio-temporal característico, asociado con el curso de la enfermedad. Este patrón de distribución permite la identificación de seis estadios (I-IV) caracterizados en 1991 por Braak y Braak (Braak y Braak 1991).

Las muestras humanas de hipocampo y giro parahipocampal analizadas en el presente trabajo han sido previamente clasificadas por los Biobancos correspondientes según los estadios de Braak para la patología de tau (Braak II, individuos en estadios iniciales asintomáticos; Braak III-IV, individuos en estadios moderados; Braak V-VI, individuos con enfermedad de Alzheimer). Aun así, hemos realizado estudios inmunohistoquímicos y de *Western blots* para diferentes formas de fosforilación y agregación de tau (el anticuerpo AT8 para las fosforilaciones en Ser199/202/Thr205; y el anticuerpo AT100 para la fosforilaciones en Ser19/Ser202/Thr205/Thr212/Ser214) para conocer en mayor detalle el grado de afectación de la patología asociada a fosfo-tau en cada una de las regiones para una mejor interpretación y correlación de los datos en su conjunto. En las muestras *post mortem* de los individuos Braak II analizadas aparecen cambios neurofibrilares en forma de NFTs en las neuronas piramidales de CA1/CA2 así como en las capas II-III de la corteza perirrinal y entorrinal del giro parahipocampal. En los casos Braak III, los NFTs y NTs se extienden por todas las capas de CA1/CA2, por las capas III y V del giro parahipocampal y afectan también al giro dentado y en mayor medida al subículo. Las muestras Braak IV exhiben un gran incremento en la inmunorreactividad para fosfo-tau de manera generalizada en todo el hipocampo y subículo, y en la corteza perirrinal y

entorrinal se pueden distinguir todas las capas. Finalmente, los individuos dementes Braak V-VI presentan una extensa patología neurofibrilar por todas las regiones de la formación hipocampal y del giro parahipocampal, con una gran cantidad de NFTs, NTs, así como también neuritas distróficas asociadas a las placas de A β . Por lo tanto, nuestras muestras humanas desarrollan lesiones neurofibrilares asociadas a la patología de tau que progresan siguiendo el patrón espacio-temporal determinado descrito previamente (Braak y Braak, 1991). Es de destacar que las fosforilaciones reconocidas por AT8 tienen lugar antes que las reconocidas por AT100, de forma que estos anticuerpos permiten visualizar la dinámica temporal de fosforilación de tau. Es de destacar que mientras la patología tau se inicia en el hipocampo y después progresa hacia otras regiones, la patología amiloide parece tener un patrón inverso, iniciándose en regiones corticales y progresando en último lugar hacia el hipocampo.

Los diferentes análisis realizados en nuestras muestras humanas para la caracterización de los rasgos histopatológicos relacionados con la patología amiloide, la respuesta neuroinflamatoria o los procesos neurodegenerativos han sido confrontados entre los diferentes grupos de individuos clasificados según los estadios de Braak, y aunque la progresión de los cambios neurofibrilares asociados a fosfo-tau se correlacionan bien con el deterioro cognitivo (Arriagada et al. 1992), reflejando de alguna manera el curso clínico de la enfermedad de Alzheimer, cabe mencionar que esta clasificación puede no resultar adecuada en el estudio de otras lesiones que sigan un patrón de distribución y progresión diferente. Por este motivo, y porque el único grupo de casos que fueron diagnosticados clínicamente con demencia se corresponde con los individuos Braak V-VI, hemos preferido distinguir entre casos dementes, con enfermedad de Alzheimer (Braak V-VI) y casos no dementes, en estadios iniciales y moderados de la patología tau (Braak II y Braak III-IV, respectivamente).

4.1.2. Los pacientes de Alzheimer acumulan formas solubles de tau hiperfosforilado

El análisis por *Western blot* empleando las proteínas totales de hipocampo de las mismas muestras humanas apoyaron los resultados inmunohistoquímicos al obtenerse un incremento de las formas monoméricas y oligoméricas de tau fosforiladas en los individuos Braak V-VI (dementes) en comparación con los individuos Braak II y Braak III-IV. Además, la fracción de proteínas solubles S1 del hipocampo de estos individuos también presenta una mayor acumulación significativa de monómeros fosforilados de tau en los casos Braak V-VI, en comparación con los estadios leves y moderados.

En la enfermedad de Alzheimer, el número de NFTs en la corteza se correlaciona positivamente con la severidad en el declive cognitivo (Arriagada et al. 1992) por lo que se puede asumir que los ovillos neurofibrilares son capaces de inducir daño neuronal directamente, por ejemplo actuando como una barrera física en el citoplasma y entorpeciendo las funciones celulares. Un estudio demuestra que en el ratón transgénico P301L la formación de agregados filamentosos de tau provoca el desplazamiento de los orgánulos y además, disminuye el número de éstos (Lin et al. 2003). Sin embargo, muchas de las neuronas que acumulan NFTs presentan una morfología nuclear

aparentemente normal e incluso pueden seguir estableciendo contactos sinápticos y además el número de neuronas que mueren no parecen tener una gran carga de tau fibrilar (Kuchibhotla et al. 2014). Estos estudios sugieren que la toxicidad de tau no requiere la formación de ovillos neurofibrilares, sino que formas prefibrilares u oligoméricas fosforiladas solubles, formadas en un estadio anterior al ensamblaje de los NFTs podrían ser las formas tóxicas. Son muchos los estudios recientemente, en modelos de tauopatías neurodegenerativas, que han demostrado que son las formas solubles de tau y no los ovillos neurofibrilares, las que causan un mayor daño sináptico (Gendron y Petrucelli 2009; Crimins et al. 2013; Takashima 2013). En estos estudios las formas de tau solubles están relacionadas con la pérdida de espinas dendríticas, de proteínas sinápticas así como con la disminución en la expresión de receptores de glutamato AMPA y NMDA (Hoover et al. 2010). Además, también se ha observado que la fracción sináptica de cerebros de pacientes de Alzheimer presenta una mayor cantidad de tau hiperfosforilado, indicando un posible rol directo de tau en la pérdida sináptica documentada en la AD (Tai et al. 2012).

Estos daños, al igual que los cambios provocados en el transporte dendrítico y axonal en presencia de altos niveles de formas solubles de tau, ocurren de manera temprana, previa a la acumulación de NFTs en modelos animales (Crimins et al. 2013). Esto mismo podría estar ocurriendo en los pacientes de Alzheimer, ya que se han detectado altos niveles de formas oligoméricas de tau en los estadios iniciales de la enfermedad (Lasagna-Reeves et al. 2012). Además, la alteración del transporte dependiente de los microtúbulos en las tauopatías neurodegenerativas causa una grave patología neurítica que afecta a la morfología y funcionalidad de axones y dendritas (Ballatore et al. 2007).

Los sistemas de degradación de proteínas son los encargados de eliminar las proteínas malplegadas o dañadas que puedan formar agregados tóxicos. La vía proteosomal así como la vía autofágica-lisosomal se encuentran alteradas con el envejecimiento, proporcionando una gran vulnerabilidad a la acumulación de tau (Gavilán et al. 2009; Paz Gavilán et al. 2006). En este sentido nuestro grupo de investigación ha demostrado en el modelo APP/PS1 que el desarrollo de neuritis distróficas de naturaleza axonal/sináptica está relacionado con la alteración de los sistemas de proteostasis celular, acumulándose en el interior de las distrofias abundantes vesículas autofágicas y proteínas ubiquitinadas como resultado de la alteración del citoesqueleto y fallos en el transporte axonal (Sanchez-Varo et al. 2012; Torres et al. 2012). Aunque nuestro modelo no presenta mutaciones para tau, es un claro ejemplo de la gran vulnerabilidad que presentan los sistemas encargados de eliminación de proteínas ante un aumento en la concentración de proteínas disfuncionales. Este hecho, así como el incremento descrito previamente en los pacientes de AD en la actividad de las quinasas GSK3 β y Cdk5, encargadas de la fosforilación de tau, la disminución de la defosforilación de tau por parte de las fosfatasa (Götz 2001), y finalmente, la posible fosforilación de tau por las formas solubles de A β (De Felice et al. 2008; Jin et al. 2011) podrían ser los causantes de la acumulación de tau hiperfosforilado que hemos documentado en el hipocampo y giro parahipocampal de los enfermos de Alzheimer. La liberación de tau al espacio extracelular, causado por un proceso de muerte neuronal o estimulación, produciría un aumento de tau en el compartimento intersticial y este tau podría ser internalizado por otras neuronas vía endocitosis

produciendo una propagación tipo-prión de la patología tau en el cerebro. A este respecto, la disminución de los niveles de tau soluble mediante supresión génica en un modelo animal, previno la pérdida sináptica y la propagación transináptica de la patología (Polydoro et al. 2013). Es más, se ha descrito el efecto beneficioso de la eliminación de formas extracelulares de tau mediante inmunoterapia en modelos animales (Boutajangout et al. 2011; Chai et al. 2011; d'Abramo et al. 2013; Yanamandra et al. 2013).

4.1.3. La progresión de la patología amiloide muestra una gran variabilidad regional e interindividual en los pacientes, con afectación del hipocampo solo en las fases más avanzadas de la enfermedad.

Otra de las proteínas que se acumula en exceso en el cerebro de los pacientes de Alzheimer, es el péptido β -amiloide, capaz de agregarse y formar una de las lesiones histopatológicas más características de la AD, las placas seniles. De hecho, la aparición de las placas de A β es el primer evento patológico que ocurre, y de acuerdo con la hipótesis de la cascada amiloide, el agente desencadenante de los procesos citotóxicos y neurodegenerativos que acontecen en la AD (Hardy y Higgins 1992). En regiones como la isocorteza asociativa temporal, la carga amiloide alcanza su máximo en fases preclínicas de la enfermedad (Thal et al. 2002; Fillenbaum et al. 2008; Duyckaerts et al. 2009; Castellani et al. 2010; Thal et al. 2014)

En este trabajo hemos puesto de manifiesto que la patología amiloide en el hipocampo y giro parahipocampal de las muestras humanas analizadas presenta una gran variabilidad temporal, regional e interindividual a lo largo de la progresión de la enfermedad, con formación de diferentes tipos de depósitos amiloides dependiente de la región. Mientras que el giro parahipocampal muestra una grave afectación por la acumulación de A β pudiendo presentar o no placas desde estadios leves Braak II, la formación de placas en el hipocampo sucede en fases más avanzadas y siguiendo un patrón topográfico espacio-temporal determinado, comenzando en la región CA1/subículo y capa molecular del giro dentado en los individuos clasificados en estadios moderados de la patología tau (Braak III-IV) y afectando en último lugar al hilio o capa polimórfica del giro dentado en las muestras de pacientes dementes (Braak V-VI). Por lo tanto, de igual modo que ocurre con los estadios de Braak para los ovillos neurofibrilares, se puede identificar un patrón topográfico espacio-temporal de progresión de la patología amiloide en nuestras muestras humanas que sería el siguiente, de manera general: corteza perirrinal, presubículo, corteza entorrinal, subículo, CA1, capa molecular y capa polimórfica del giro dentado (GD). Aunque los individuos en estadio leve y moderado de la patología tau, Braak II y Braak III-IV respectivamente, exhiben mayor variabilidad, sobretodo en el giro parahipocampal, pudiendo desarrollar o no placas de A β , el hipocampo muestra un patrón más específico y todos los casos Braak V-VI (individuos dementes) presentan placas seniles en el hipocampo (además de en el giro parahipocampal). A pesar de la poca predictividad de la progresión de la patología amiloide, se han establecido dos sistemas de evolución topográfica, uno basado en 3 estadios (denominados A, B y C) por Braak y Braak en 1991 (Braak y Braak 1991) y otro de 5 estadios por Thal y colaboradores (Thal et al. 2002). Las fases de Thal han sido por su incorporadas en la guía

de diagnóstico neuropatológico del Instituto Nacional de Envejecimiento (NIA)-Asociación de Alzheimer de Estados Unidos (Hyman et al. 2012; Montine et al. 2012). Las muestras humanas utilizadas no fueron clasificadas previamente por los Biobancos de procedencia para la patología amiloide siguiendo estos sistemas, por lo que ha sido fundamental realizar en este trabajo de Tesis Doctoral una caracterización inmunohistoquímica previa para conocer el grado de afectación regional de cada caso y correlacionar los datos con otras alteraciones patológicas.

Es destacable que la patología amiloide en nuestras muestras humanas se desarrolla de manera mucho más leve que la patología tau, afectando en último lugar a la región del hipocampo, una de las primeras regiones afectadas por la patología tau. Otro hecho notable, es que en los pacientes además de existir una gran variabilidad interindividual, la acumulación de depósitos amiloides es significativamente menor (en especial en el hipocampo) en comparación con los ratones transgénicos APP/PS1, en los que la acumulación extracelular de A β es mucho más agresiva y comienza de manera temprana en el subículo e hipocampo propio. Ésta marcada diferencia a nivel de la patología amiloide entre pacientes y modelos transgénicos se ha comprobado mediante *Western blot* en muestras de hipocampo de animales APP/PS1 de 18 meses y pacientes en fases avanzadas (Braak V-VI), detectándose una acumulación notablemente mayor de monómeros y oligómeros de A β en los modelos.

La patología amiloide de nuestro modelo animal APP/PS1 ha sido previamente caracterizada por nuestro grupo con detalle. En este modelo, la formación de placas de A β ocurre de manera muy temprana, a partir de los 2 meses en el subículo (Trujillo-Estrada et al. 2014) y entre los 3-4 meses en el hipocampo (Blanchard et al. 2003; Ramos et al. 2006; Baglietto-Vargas et al. 2010) y la corteza entorrinal (Moreno-Gonzalez et al. 2009). Este modelo animal que sobreexpresa APP presenta una gran acumulación de depósitos fibrilares, cuyo número y tamaño aumenta con la progresión de la patología. Además, todas las placas están asociadas a un gran número de distrofias neuríticas (Sanchez-Varo et al. 2012) y exhiben una morfología y composición que no varía entre las diferentes regiones e individuos. Por tanto, el proceso de amiloidosis en los modelos animales es mucho más severo que en pacientes, y además se caracteriza por una homogeneidad en el tipo de placa amiloide que se forma frente a la variedad de placas observada en pacientes. Sería importante tener en cuenta estas diferencias a la hora de evaluar/trasladar a la clínica ensayos terapéuticos realizados en modelos animales centrados en modificar el curso de la patología amiloide.

4.1.4. El hipocampo de los pacientes de Alzheimer desarrolla placas neuríticas

Pese a que la formación de placas amiloides es un evento histopatológico que se produce en todos los pacientes de Alzheimer no existe una buena correlación entre su acumulación cerebral y la demencia (Arriagada et al. 1992; Gomez-Isla et al. 1997; Perez-Nievas et al. 2013). Incluso se han identificado casos *post mortem* de individuos con una gran carga de placas amiloides que eran asintomáticos, es decir sin ningún síntoma de deterioro cognitivo o demencia (Perez-Nievas et al. 2013; Iacono et al. 2014). La mayoría de estos estudios clínico-patológicos están basados en regiones corticales en los que la patología amiloide presenta una gran variabilidad. Es más, los pacientes de

Alzheimer desarrollan diferentes tipos de placas (difusas, clásicas, fibrilares), las cuales pueden asociarse o no con neuritas distróficas. El estudio de Pérez-Nievas y colaboradores (2013) demuestra que, aunque la carga amiloide total sea similar en pacientes de Alzheimer (con demencia) y en casos asintomáticos (controles con elevada patología pero sin síntomas clínicos; *high pathology controls*), los individuos dementes presentan una mayor cantidad de depósitos fibrilares neuríticos que las personas sanas. Por tanto, el desarrollo de placas fibrilares y la formación de distrofias es un fenotipo patológico que permite discriminar a individuos dementes de no dementes con una elevada carga amiloide. Además, es cada vez más usado el criterio neuropatológico CERAD (del inglés *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*) para el diagnóstico *post mortem* de la AD que se basa en el análisis de la severidad de las lesiones neuríticas asociadas a las placas de A β (Mirra et al. 1991; Kovacs y Gelpi 2012). Es bien sabido que las placas amiloides pueden producir una alteración patológica en las prolongaciones axonales provocando engrosamientos locales por la acumulación de vesículas (mayoritariamente autofágicas) que dan lugar a neuritas distróficas (Nixon 2007; Sanchez-Varo et al. 2012). La formación de estas distrofias axonales es una consecuencia de la alteración local del citoesqueleto (por fosforilación de tau y desestabilización de los microtúbulos) que produce fallo en el transporte axonal y la consecuente acumulación de vesículas (Torres et al. 2012; Sanchez-Varo et al. 2012). Además, en el caso de nuestro modelo animal, junto con la patología axonal y el incremento en el metabolismo del APP, tiene lugar una reducción de la actividad lisosomal con la edad que resulta en una disminución de la capacidad proteolítica intracelular (Torres et al. 2012).

En esta línea, hemos analizado los diferentes tipos de placas amiloides que se encuentran en el hipocampo y giro parahipocampal de los pacientes de Alzheimer así como la degeneración neurítica asociada. Los depósitos de A β que se desarrollan en la región CA1 del hipocampo, que suelen aparecer desde los estadios moderados de la patología neurofibrilar (Braak III-IV), son en su mayoría de tipo clásico, con un núcleo fibrilar y compacto, un halo periférico difuso de A β oligomérico y neuritas distróficas situadas entre el núcleo y la periferia difusa; las placas de la capa molecular del giro dentado, que se desarrollan también desde estadios moderados, son siempre compactas, fibrilares y neuríticas (las distrofias asociadas se corresponden con axones que proceden de la capa II de la corteza entorrinal; Hyman et al. 1984) y; por último, las placas del hilio del giro dentado aparecen únicamente en los pacientes dementes Braak V-VI y se corresponden con depósitos de gran tamaño, fibrilares en su totalidad, con forma estrellada (característica de esta región) y con una gran cantidad de neuritas distróficas de tamaño enorme dispuestas en la periferia.

Por lo tanto, todas las placas de A β que se forman en el hipocampo de nuestros pacientes de Alzheimer presentan neuritas distróficas asociadas. En concreto, los depósitos amiloides observados en el hilio del giro dentado son muy similares a los que exhibe el modelo APP/PS1. Podemos especular a partir de estos resultados que, 1) la afectación amiloide y neurítica que acontece en la región hipocampo podría correlacionarse con la fase de demencia de los pacientes de Alzheimer; y 2) probablemente exista una diferente etiología de los depósitos amiloides en las distintas regiones afectadas en los pacientes. En relación a esto último, las placas fibrilares y neuríticas que se forman en la capa polimórfica de los enfermos de Alzheimer, diferentes a las que se originan en el resto de la

formación hipocampal, podrían tener un origen similar con las que se desarrollan en nuestro modelo APP/PS1 dado su parecido estructural. La acumulación de A β en el hipocampo de las muestras humanas presenta una distribución topográfica laminar, de manera que los depósitos que se acumulan en CA1 lo hacen siguiendo el estrato lacunoso-molecular, coincidiendo con las conexiones de la vía alveolar, procedentes de la corteza entorrinal, y los que se desarrollan en el giro dentado comienzan distribuyéndose de manera ordenada en la capa molecular, coincidiendo con la entrada de axones de la vía perforante (conexiones procedentes de la corteza entorrinal y que suponen la principal vía de comunicación aferente del hipocampo). Aunque son muchas las hipótesis formuladas sobre el origen de las placas, mediante estudios de trazado de las proyecciones de la vía perforante, se ha visto que el APP es transportado de forma anterógrada, acumulándose en los terminales presinápticos de las neuronas de la corteza entorrinal (Buxbaum et al. 1998). También, se ha demostrado que la lesión de la vía perforante de ratones transgénicos APP reduce la carga de A β en el giro dentado (Lazarov et al. 2002). Estos hallazgos indican que el APP transportado axonalmente desde la corteza entorrinal es procesado hasta A β y liberado en los terminales presinápticos del giro dentado (Su y Ni 1998), y por lo tanto, la liberación sináptica de A β al menos en el hipocampo podría explicar la particular distribución de las placas encontradas en los pacientes de Alzheimer. De hecho, la acumulación de A β en el cerebro está directamente relacionada con la actividad sináptica y se ha descrito la presencia de A β oligomérico en compartimentos pre y post-sinápticos de muestra post mortem de pacientes (revisado en Spires-Jones y Hyman 2014). La acumulación de A β intracelular, en las neuritas distróficas o la difusión del amiloide hacia los espacios perivasculares (Thal et al. 2006, 2002), así como el fallo en los sistemas de eliminación proteica de la propia maquinaria neuronal o fallos en el aclaramiento del A β del líquido intersticial por parte del sistema vascular a través de la barrera hematoencefálica y de las células astrogiales (aclaramiento glinfático) son otras de las propuestas del posible origen de las placas seniles (revisado en Tarasoff-Conway et al. 2015).

4.1.5. El giro parahipocampal de los pacientes presenta una variedad de depósitos amiloides

Como ya hemos mencionado, a diferencia de lo observado en la formación hipocampal, las placas de las regiones corticales del giro parahipocampal, como la corteza perirrinial o la corteza entorrinal presentan una gran variedad de depósitos amiloides, dentro del mismo individuo y entre las diferentes muestras analizadas, en cuanto a su composición (fibrilares/difusas) y proporción de placas neuríticas. Los principales tipos de placas encontradas fueron placas de tipo difuso (negativas para las formas fibrilares de A β), con una forma indefinida, y placas clásicas neuríticas, similares a las encontradas en la región CA1 del hipocampo. Además, la proporción de placas neuríticas no solo es una característica variable en los individuos de estadios iniciales y moderado, sino también en la corteza del giro parahipocampal de los individuos dementes. Cabe destacar que tan solo las placas neuríticas se encuentran asociadas a microglía reactiva (este punto se discutirá más adelante) (Nagele et al. 2004; Duyckaerts et al. 2009; D'Andrea y Nagele 2010; Serrano-Pozo et al. 2013b).

Debido a que la mayoría de los individuos Braak II presentan solo placas difusas y que la proporción de placas neuríticas encontradas aumenta con la progresión de los estadios de Braak,

nuestros datos apoyan la idea, tal y como sugieren otros investigadores, de que los depósitos de tipo difuso se corresponderían con fases iniciales de formación, y que luego evolucionarían hacia formas neuríticas (Dickson y Vickers 2001; Thal et al. 2002, 2006; Braak et al. 2013).

Así pues, las placas no serían estructuras inertes, sino de naturaleza dinámica que evolucionarían a lo largo de la patología pudiendo cambiar sus propiedades en cuanto a composición, tamaño y posiblemente toxicidad. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha demostrado en el modelo APP/PS1 que las placas incrementan no solo en número sino también en tamaño con la edad y progresión de la enfermedad (Moreno-Gonzalez et al. 2009; Trujillo-Estrada et al. 2014; Núñez-Díaz 2014). Aunque por otro lado, Serrano-Pozo y colaboradores (Serrano-Pozo et al. 2012) han determinado que no existe correlación entre el tamaño de las placas fibrilares y la progresión patológica, sino que el crecimiento de las placas ocurre a lo largo de la fase preclínica, hasta alcanzar un tamaño estable. De hecho, la acumulación de A β puede comenzar incluso 20 años antes de que se inicien los primeros síntomas (Bateman et al. 2012).

Sin embargo, estudios previos de nuestro grupo en el modelo animal APP/PS1 han demostrado una disminución en el grado de compactación de las placas así como un incremento en el tamaño del halo de oligómeros de A β (sugere de un aumento de su capacidad tóxica) con la edad tanto en el subículo como en el hipocampo (Núñez-Díaz 2014), indicando una evolución dinámica de las propiedades de las placas con la progresión de la enfermedad.

Estos resultados sobre los cambios dinámicos de las placas no han podido ser corroborados en las muestras de pacientes debido a la gran variabilidad de la patología amiloide que presenta el hipocampo y giro parahipocampal. Hubiese sido necesario analizar un mayor número de muestras para obtener datos significativos. Sin embargo, sí que hemos obtenido un incremento significativo del área ocupada por depósitos de A β oligomérico (positivos para el anticuerpo conformacional OC, Sarsoza et al. 2009) en la corteza perirrinal de los pacientes de Alzheimer (Braak V-VI), en comparación con los individuos de estadio leve y moderado de la patología tau (Braak II y Braak III-IV).

4.1.6. Las placas amiloides podrían ser una fuente de A β oligomérico soluble

Aunque la carga amiloide total no se correlaciona bien con el deterioro cognitivo, los niveles de A β oligomérico sí que guardan una alta correlación con la demencia en la AD (Tomic et al. 2009; Mc Donald et al. 2010). De hecho, actualmente se cree que son las formas solubles de A β las principales causantes de la toxicidad sináptica y neuronal (Sakono y Zako 2010; Zempel et al. 2013; Crimins et al. 2013; Spires-Jones y Hyman 2014; Viola y Klein 2015). En este sentido, nuestro grupo ha determinado un aumento de los niveles de A β oligomérico soluble en el hipocampo coincidente con el proceso neurodegenerativo de las células principales en nuestro modelo APP/PS1 (Jimenez et al. 2008). Es más, hemos demostrado que el A β oligomérico actúa inhibiendo la vía PI3k/Akt/GSK-3 β afectando así a la supervivencia neuronal (Jimenez et al. 2011).

Dada la importancia de las formas solubles oligoméricas de A β en la AD, se han realizado numerosos estudios con el objetivo de determinar los niveles y naturaleza de estas especies tóxicas

en muestras de pacientes, obteniendo resultados contradictorios. Algunos autores han descrito grandes cantidades de formas monoméricas y diméricas de A β soluble (Mc Donald et al. 2010; Watt et al. 2013; Yang et al. 2013; Dohler et al. 2014; Rijal Upadhaya et al. 2014) mientras que otros han encontrado cantidades pequeñas de estas formas (Tomic et al. 2009; Esparza et al. 2013). Nuestro grupo ha publicado recientemente que las diferencias encontradas entre los distintos laboratorios en los niveles de A β soluble se deben al método empleado para la preparación de la fracción soluble S1, de forma que bajo determinadas condiciones de homogeneización del tejido (ej. sonicación) se provoca una movilización artefactual de A β desde las placas (Jimenez et al. 2014). Es por tanto, la pérdida de integridad de las placas la causa de un aumento de los niveles de A β soluble. En base a esto, proponemos que las placas amiloides podrían sufrir, de forma natural, cambios en su integridad durante la progresión de la patología y actuar como fuente de oligómeros de A β . De cualquier forma, los niveles de A β soluble en el hipocampo de nuestras muestras humanas Braak V-VI es muy pequeño (Jimenez et al. 2014) en consonancia con la escasa y tardía patología amiloide de esta región. Los bajos niveles de A β soluble en muestras de pacientes de Alzheimer contrasta con los altos niveles de tau fosforilado en la fracción S1, lo que sugiere que podrían ser principalmente las formas solubles de tau las desencadenantes del proceso neurodegenerativo en humanos. La gran mayoría de los modelos transgénicos están basados en la sobreexpresión de APP y producción de A β , pero no forman ovillos neurofibrilares y no acumulan fosfo-tau soluble extracelularmente, lo que podría explicar la escasa muerte neuronal en dichos modelos en comparación con los pacientes.

Independientemente de los escasos niveles de A β soluble en el hipocampo de los pacientes, el papel tóxico de estas formas es indiscutible. Los oligómeros solubles tienen un papel crítico en la patología interviniendo en las vías de señalización intracelulares implicadas en la plasticidad sináptica, en la neurogénesis y en la muerte neuronal, alteración de la función mitocondrial y lisosomal, alteraciones sinápticas, excitotoxicidad e hiperexcitación de circuitos neuronales, y activación de cascadas neuroinflamatorias en las células gliales (Crews y Masliah 2010; Viola y Klein 2015). Los oligómeros solubles de A β pueden inducir apoptosis (Yamamoto et al. 2007), pueden unirse a receptores NMDA causando alteración de la homeostasis del calcio, estrés oxidativo y pérdida sináptica (De Felice et al. 2007) (De Felice et al. 2007; Shankar et al. 2007), pueden también inducir la pérdida de receptores de insulina en la membrana neuronal (Zhao et al. 2008) y afectar a la actividad quinasa asociada a la LTP (Townsend et al. 2007). Además, los oligómeros de A β , mediante la unión al receptor *Frizzled* pueden incrementar la fosforilación de tau mediante la activación de la ruta de la GSK3 β (Magdesian et al. 2008). Por lo tanto, y sumando a las evidencias obtenidas en el modelo APP/PS1 y en otros estudios tanto en pacientes como en modelos animales, de que las placas provocan distrofias neuríticas y pérdida sináptica (Busche et al. 2008; Koffie et al. 2009; Bittner et al. 2012), la formación de distrofias neuríticas asociadas a las placas, así como la pérdida neuronal observada en el hipocampo y corteza perirrinal de los pacientes (se discutirá más adelante) podría deberse a la liberación de oligómeros de A β por parte de los depósitos amiloides al parénquima nervioso. Por tanto, los niveles de A β oligomérico soluble dependería de la capacidad de las placas para liberar estas formas tóxicas. En apoyo a esta idea, se ha demostrado

experimentalmente la capacidad de lípidos endógenos presentes en el cerebro de desnaturalizar y resolubilizar fibras amiloides, así como el efecto perjudicial de estas formas solubles a nivel cognitivo en ratones (Martins et al. 2008). Esto implicaría que cambios en el contenido lipídico cerebral podría influenciar sobre los depósitos amiloides insolubles, considerados hasta ahora como estructuras inertes, liberando formas altamente tóxicas.

La mayor parte de las estrategias terapéuticas para frenar la progresión de la enfermedad de Alzheimer se basa en la eliminación del péptido A β mediante inmunización (activa o pasiva), puesto que la hipótesis de la cascada amiloide es, a día de hoy, la más aceptada. Sin embargo, todas las terapias desarrolladas en modelos animales han resultado ineficaces al extrapolarlas a los pacientes (Lannfelt et al. 2014; Iqbal et al. 2014). Además, en algunas ocasiones se ha logrado reducir la carga de A β en los pacientes pero sin ninguna mejoría en la capacidad cognitiva (Rinne et al. 2010). La explicación más factible para el fracaso de estas terapias es que los cambios neuronales acontecidos 20 años atrás por la acumulación de proteínas tóxicas son ya irreversibles. Es por este motivo, junto con la escasa correlación entre la carga amiloide y el deterioro cognitivo (Arriagada et al. 1992; Gomez-Isla et al. 1997; Perez-Nievas et al. 2013) que se ha cuestionado la hipótesis de la cascada amiloide así como la utilidad del péptido A β como diana terapéutica.

Sin embargo, el hecho de que nuestras muestras de pacientes de Alzheimer presenten todos acumulación extracelular de A β con neuritas distróficas en el giro dentado, así como la presencia de formas solubles de A β tanto en los pacientes (aunque escasa) como en modelos APP/PS1, nos lleva a no poder descartar al A β como agente tóxico implicado, junto a fosfo-tau, en el proceso neurodegenerativo característico de esta patología. Es más, se propone la acción conjunta de ambas especies proteicas solubles (A β y fosfo-tau) como responsable de la toxicidad sináptica en la AD (revisado en Spires-Jones y Hyman 2014).

Consideramos que sería importante analizar en mayor detalle la heterogeneidad de las placas amiloides en las distintas regiones y comprobar experimentalmente la capacidad tóxica de los diversos tipos de depósitos *in vivo* e *in vitro*. Es posible que la escasa correlación entre la carga amiloide y los síntomas en los pacientes se sustente en la patente variabilidad interindividual de la patología amiloide observada en las muestras humanas y al diferente potencial tóxico de dichas placas para liberar formas solubles.

4.1.7. Los enfermos de Alzheimer desarrollan una extensa patología amiloide asociada a los vasos sanguíneos

En el presente trabajo se ha identificado la existencia de A β en la pared de los vasos sanguíneos tanto en el hipocampo como en el giro parahipocampal de los individuos Braak IV-VI. El A β localizado en estos vasos podría involucrarse en los procesos descritos en la hipótesis vascular, tales como la disfunción vascular y daños tisulares asociados. Esta hipótesis, que considera que la AD tiene su origen en una patología vascular (de la Torre 2002; Kalaria 2003), se basa en que los daños a

nivel vascular son factores de riesgo para esta enfermedad, en el solapamiento de la histopatología y síntomas de la AD con los de la demencia vascular, en la existencia de sustancias que mejoran la perfusión cerebral y reducen el riesgo de AD, en evidencias de que la hipoperfusión cerebral aparece precediendo la patología degenerativa y cognitiva, y en la angiopatía cerebral amiloide (ACC) asociada a la enfermedad de Alzheimer (Thal et al. 2008).

Muchos de los modelos transgénicos para la AD presentan una severa ACC, como son los modelos APPDutch, SweDI, APP/FI (Philipson et al. 2010), en los que la ACC llega a comenzar incluso a los 3 meses de edad, puesto que estos animales presentan una elevada producción de A β 1-40, el cual se deposita principalmente alrededor de los vasos. El A β se transporta a través de la barrera hematoencefálica y puede ser absorbido por la sangre mediante el receptor de LDL (LRP1), además de ser drenado perivascularmente junto con otros solutos del líquido intersticial a lo largo de los capilares y arterias (Tarasoff-Conway et al. 2015). Las placas de A β por tanto, pueden originarse también, como ya hemos comentado anteriormente, por un fallo en los sistemas de eliminación y aclaramiento del péptido A β , especialmente a través de circulación sanguínea.

En una situación patológica como el Alzheimer, los niveles de neprilisina e IDE (enzimas que degradan el A β) también disminuyen de forma considerable, por lo que se acentúa el desvío del A β hacia la ruta de drenaje perivascular y la difusión de éste hacia la superficie del cerebro para depositarse en los espacios extracelulares del parénquima cerebral para formar las placas. La eliminación perivascular del péptido A β falla con la edad por el endurecimiento de las paredes de las arterias, por lo que se reduce la fuerza motriz para el drenaje del A β , además, este drenaje también se reduce fuertemente por la deposición de A β fibrilar, que no solo bloquea el drenaje del A β sino también otros metabolitos solubles. Finalmente, se pierde la homeostasis y se deteriora el ambiente extracelular de las neuronas, lo que puede contribuir aún más a la muerte neuronal y en general, al conjunto de los eventos tóxicos que ocurren en la AD.

4.2. DISFUNCIÓN DE LA HOMEOSTASIS GLIAL EN LAS MUESTRAS HUMANAS CON PATOLOGÍA TIPO ALZHEIMER

Se ha propuesto la existencia de un proceso neuroinflamatorio (activación glial) que podría desempeñar un papel clave en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (Heneka et al. 2015), aunque todavía se desconoce si este papel es perjudicial y/o beneficioso (Perry et al. 2010; Cunningham 2013; Aguzzi et al. 2013; Mizuno 2012; Latta et al. 2014). Clásicamente, la respuesta microglial se ha asociado al proceso neurodegenerativo que tiene lugar en esta enfermedad. La respuesta inflamatoria conducida por la microglía conlleva la liberación local de varios mediadores inflamatorios, como citoquinas potencialmente neurotóxicas, la activación de la cascada del complemento y a la inducción de sistemas enzimáticos que originan especies reactivas de oxígeno sumamente citotóxicas (Cai et al. 2015; Mosher y Wyss-Coray 2014; Li et al. 2014). Además, la microglía activada también es capaz de reclutar astrocitos y activarlos, incrementando el proceso

inflamatorio y contribuyendo así a la cascada neurodegenerativa. Esta visión citotóxica de la activación microglial está basada principalmente en lo observado en modelos transgénicos de la enfermedad (Heneka et al. 2014).

En base a que la implicación de la reactividad glial (microglía y astrogliá) en la patología de la enfermedad de Alzheimer no es conocida y que la mayoría de la información, tanto a nivel molecular como celular ha sido obtenida a partir de modelos transgénicos de la enfermedad, en este trabajo de Tesis Doctoral hemos analizado la respuesta microglial y astrogliá en muestras humanas *post mortem* durante la progresión de los estadios de Braak. Nuestros datos revelan que, a diferencia de lo observado en modelos transgénicos de la enfermedad donde se observa una patente y progresiva activación microglial con el avance de la patología, el proceso de activación de dichas células microgliales en pacientes es muy limitado o parcial (exclusivamente asociado a placas amiloides fibrilares y exhibiendo cambios morfológicos moderados) existiendo además una significativa degeneración de la población microglial en los individuos con demencia (Braak V-VI). Este hecho subraya la necesidad de mejorar los modelos animales existentes para ésta enfermedad modificando la respuesta glial para que resulten útiles en la experimentación preclínica para el desarrollo de estrategias terapéuticas eficaces.

4.2.1. Existe una limitada activación microglial en los pacientes, en contraposición a la extensa reactividad microglial de los modelos transgénicos de amiloidosis

Nuestro grupo de investigación ha descrito previamente la existencia de un proceso inflamatorio temprano, con activación microglial y astrogliá, asociado temporal y físicamente a las placas de A β en el hipocampo y la corteza entorrinal del modelo APP_{751SL}/PS1_{M146L}, que progresa severamente con la edad (Jimenez et al. 2008; Moreno-Gonzalez et al. 2009). A edades tempranas (4 meses), y coincidiendo con la acumulación extracelular de A β , en el hipocampo la microglía activada se encuentra exclusivamente rodeando las placas amiloides. Sin embargo, a la misma edad en la corteza entorrinal, la microglía reactiva también se encuentra en zonas interplaca, fundamentalmente en las capas profundas, donde abundan las placas. Esta respuesta inflamatoria temprana en la corteza entorrinal presenta un perfil potencialmente citotóxico (fenotipo M1), con expresión de citoquinas proinflamatorias (TNF α), coincidiendo temporalmente con el proceso neurodegenerativo acaecido en esta región cerebral (Moreno-Gonzalez et al. 2009). Sin embargo, en el hipocampo, la microglía activada alrededor de las placas muestra un fenotipo alternativo fagocítico (M2), con expresión de citoquinas anti-inflamatorias y factores neurotróficos y por tanto, con un posible papel neuroprotector. Esta diferenciación alternativa de la microglía en fases tempranas explicaría la escasa muerte neuronal que tiene lugar en el hipocampo de nuestro modelo durante ese periodo. Sin embargo, a edades más avanzadas (18 meses), la activación microglial se extiende a regiones interplaca del hipocampo mostrando, en este caso, un fenotipo clásico, con expresión de factores proinflamatorios (TNF α). Por lo tanto, en el hipocampo de nuestro modelo animal, la respuesta inflamatoria pasa de ser potencialmente neuroprotectora en fases tempranas de la patología, a mostrar un perfil citotóxico en las fases más avanzadas coincidiendo con el incremento

de formas oligoméricas solubles de A β en el parénquima hipocampal. Estas formas solubles de los modelos, además de estimular a la microglía, afectan directamente a las neuronas incrementando su vulnerabilidad (Carriba et al. 2015). En base a estos hechos, parece que la microglía ejercería un papel citotóxico para las neuronas en la patología del Alzheimer.

En el presente trabajo de Tesis Doctoral hemos identificado que en el hipocampo y giro parahipocampal de los pacientes de Alzheimer tiene lugar una limitada activación microglial asociada a los depósitos extracelulares de A β , en contraposición a lo descrito en los modelos APP/PS1. En su conjunto, estos datos implican, por una parte, que los actuales modelos transgénicos (sobre todo los basados en la sobre-expresión de A β) no mimetizan la respuesta microglial observada en los pacientes de Alzheimer, y por otra parte la necesidad de reevaluar la hipótesis de la respuesta neuroinflamatoria en esta enfermedad.

Esta afirmación de una activación microglial parcial en las muestras humanas de Alzheimer está basada en las características morfológicas que adquieren las células microgliales cuando se diferencian y se activan (hipertrofia del cuerpo y acortamiento y ensanchamiento de las prolongaciones, entre otras) que si bien no son demasiado evidentes, las presentan los grupos o *clusters* de microglía asociados a las placas en las muestras humanas. Esta apreciación también coincide con el aumento en la expresión de Iba1, CD68 y CD45 en los casos de individuos con demencia (Braak V-VI), localizándose la inmunotinción para estos marcadores fundamentalmente en estas agrupaciones de microglía reactiva. Además, existe un incremento significativo de los niveles de ARNm para los marcadores de activación CD68 y CD45, lo que apoya la idea de que las placas de A β inducen activación microglial, como era de esperar. CD45, es un conocido receptor de membrana expresado en la superficie de todos los leucocitos, y en la actualidad empleado como marcador de macrófagos periféricos y linfocitos T (CD45^{high}) (Hickman et al. 2013; Varvel et al. 2012; Butovsky et al. 2014). Sin embargo, la población de células microgliales reactivas también son capaces de expresar grandes cantidades de esta proteína (CD45^{medium}), en comparación con la microglía en estado quiescente (CD45^{low}) (Greter et al. 2015).

A pesar de que estos resultados indican que durante la progresión de la patología, los pacientes desarrollan un proceso de activación microglial en paralelo con la acumulación de A β , dicha respuesta microglial es limitada y se encuentra restringida a las placas (en concreto, a las placas de naturaleza neurítica) a diferencia de lo que ocurre en nuestro modelo APP/PS1 (Jimenez et al. 2008) y otros modelos que sobreexpresan A β (revisado en Birch, Katsouri, y Sastre, 2014) con microglía reactiva en regiones interplaca también, y de lo descrito por otros autores en pacientes de Alzheimer (Serrano-Pozo et al. 2013a, 2013b) y en diversas enfermedades neurodegenerativas (Revisado en Heneka, Kummer, y Latz 2014).

Tras la identificación de esta limitada activación microglial en muestras de hipocampo y giro parahipocampal de pacientes de Alzheimer, analizamos el fenotipo adoptado por la microglía reactiva. Como ya se ha descrito anteriormente, en los animales APP/PS1 se produce una respuesta inflamatoria microglial predominantemente de naturaleza alternativa (M2) alrededor de las placas en

animales jóvenes, y una activación clásica o proinflamatoria (M1) en regiones interplaca del parénquima, que aparece en ratones viejos en el hipocampo y en ratones jóvenes en la corteza entorrinal. Debido a las limitaciones de inmunorreactividad del tejido *post mortem* y a la falta de buenos anticuerpos para marcadores M1/M2(a,b,c) en tejido humano, en este trabajo no hemos podido caracterizar en detalle el fenotipo(s) de la microglía reactiva en los pacientes de Alzheimer, a excepción de la citoquina proinflamatoria TNF α , y aunque se discutirá más adelante, en nuestras muestras humanas son los astrocitos y no la microglía, la población glial encargada de producir esta citoquina potencialmente citotóxica. Sin embargo, el grupo del Dr. Vitorica ha realizado estudios moleculares de los niveles de expresión de ARNm de las principales citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias en estas mismas muestras humanas determinando la existencia de una respuesta microglial leve con un fenotipo mixto M1-M2c (Navarro, 2015). Existe una gran controversia entre los resultados obtenidos por los distintos grupos de investigación en el estudio del fenotipo microglial que desarrollan los pacientes de Alzheimer. En este sentido, tanto la activación de la respuesta inflamatoria M1, como la respuesta alternativa M2, así como ambos tipos de respuestas han sido descritas en pacientes de Alzheimer. En base a estos datos, y debido a la leve y limitada activación microglial hallada en los pacientes dementes Braak V-VI, la caracterización del M1/M2 en muestras humanas no ha sido un objetivo primordial de esta Tesis Doctoral.

Estos hechos ponen de manifiesto la existencia de una diferente respuesta inmune innata en modelos transgénicos y pacientes de AD, y que podría ser una de las causas de los múltiples fracasos terapéuticos de las estrategias antiinflamatorias probadas hasta la fecha en pacientes (Meinert et al. 2009; Breitner et al. 2011; Jaturapatporn et al. 2012; The Alzheimer's Disease Anti-inflammatory prevention Trial Research Group 2013). De hecho, una posible explicación a este fracaso traslacional a la clínica humana podría estar fundamentada en la diferente respuesta microglial entre modelos y humanos. La existencia de diferencias en el perfil de citoquinas y mediadores de la respuesta inflamatoria entre pacientes de Alzheimer y modelos animales APP/PS1, así como diferencias a nivel regional y en función del estadio de la enfermedad, ha sido también recientemente descrito mediante análisis genómico funcional (López-González et al. 2015). Es de destacar por tanto la complejidad y heterogeneidad de la respuesta inflamatoria, y la necesidad de descifrar las diferencias entre modelos y pacientes con idea de desarrollar terapias más eficaces.

4.2.2. Posible papel de la microglía activada en la dinámica de formación/compactación y/o eliminación de los depósitos fibrilares

Las placas de A β pueden inducir un proceso neuroinflamatorio con activación microglial. Los factores que inducen esta activación no son bien conocidos. Estudios *in vivo* mediante el empleo del microscopio multifotón demuestran que las placas amiloides extracelulares recién formadas son capaces de reclutar y activar a las células microgliales (Meyer-Luehmann et al. 2008). Por otro lado, las células microgliales activadas pueden tener funciones beneficiosas o neuroprotectoras como frenar la formación de placas mediante fagocitosis restringiendo el crecimiento de los depósitos (Cai

et al. 2015; Heneka et al. 2015; Condello et al. 2015) o convertir el A β oligomérico soluble en formas fibrilares (Nagele et al. 2004). En esta línea, recientemente se ha relacionado determinadas mutaciones con pérdida de función en TREM2 (*del inglés Triggering Receptor expressed on myeloid cells 2*), un receptor de membrana de las células microgliales implicado en los procesos fagocíticos (revisado en Lue, Schmitz, y Walker 2014), como factor de riesgo en la enfermedad de Alzheimer (Guerreiro et al. 2013; Neumann y Daly 2012).

En este sentido, nuestros experimentos de doble marcaje inmunohistoquímico para A β (4G8) y microglía (Iba1) muestran como las células microgliales que rodean las placas de la formación hipocampal (en concreto las del giro dentado y subículo) de los individuos Braak IV-VI presentan A β intracelular, tanto en el cuerpo celular como en las prolongaciones.

Para comprobar que, efectivamente, la microglía reactiva asociada a las placas de estos pacientes presenta un fenotipo fagocítico se han analizado varios marcadores, a nivel de expresión de ARNm, implicados en la eliminación/degradación del péptido β -amiloide, como son MSR-1 (*del inglés Macrophage Scavenger Receptor 1*), CD36, SIRP β 1 (*del inglés Signal Regulatory Protein β 1*), TREM2 y CD33 (Hickman et al. 2008; Gaikwad et al. 2009; Heppner et al. 2015; Griucic et al. 2013). Tan solo los marcadores MSR-1 y SIRP β 1 muestran un incremento significativo en su expresión en los pacientes de Alzheimer con respecto a los individuos control. La diferente reactividad que presentan las placas de A β , con independencia del estadio de Braak en el que se clasifica la muestra, así como la disfunción microglial que se desarrolla en las muestras Braak V-VI (discutido más adelante) podría explicar que los niveles de ARNm de TREM2, CD33 y CD36 no muestren cambios en los pacientes de Alzheimer.

Sin embargo, junto con los resultados inmunohistoquímicos obtenidos, estos datos apoyarían un posible papel fagocítico de la microglía activada que rodea las placas, aunque también sugieren la posibilidad de un papel en la formación/compactación de los depósitos extracelulares de A β . En relación a esto último, diferentes placas de un mismo individuo muestran como aquellas con amiloide más laxo (aparentemente en fases iniciales de formación) se encuentran rodeadas por células microgliales con una gran cantidad de A β en su interior, mientras que las placas más compactas (aparentemente más maduras) se hallan asociadas con una menor cantidad de microglía con amiloide intracelular, lo que podría estar indicando un proceso temporal de formación de placas con la participación activa de la población microglial en la fibrilización/compactación del amiloide, como ya se ha sugerido previamente (Nagele et al. 2004; Condello et al. 2015).

Por tanto, en el hipocampo y giro parahipocampal de las muestras humanas analizadas la microglía podría estar ejerciendo un papel protector, concentrando/fibrilizando el A β soluble en depósitos insolubles y así evitar su difusión por el parénquima y por tanto, previniendo el efecto tóxico sobre las neuronas circundantes.

Además, los estudios de microscopía láser confocal han demostrado que, con independencia del estadio de Braak al que pertenezcan las muestras *post mortem* analizadas, son las placas de naturaleza neurítica (con distrofias APP-positivas) las que tienen la capacidad de activar a las células

microgliales y, reclutarlas a la periferia de los depósitos extracelulares, en el caso de las placas fibrilares del giro dentado y subículo, o bien movilizarlas al interior del amiloide, como ocurre en el caso de las placas de tipo clásico encontradas en la región CA1 y en el giro parahipocampal, donde la microglía se localiza rodeando el núcleo (*core*) fibrilar, de nuevo indicando una posible interacción compactación/fagocítica.

Sin embargo, los ratones transgénicos APP/PS1 no reproducen esta relación diferencial microglía/placa específica de la región y del tipo de A β , ya que en nuestro modelo animal las placas que se desarrollan son siempre fibrilares y neuríticas y por tanto, se encuentran invariablemente rodeadas y muy raramente infiltradas, por células microgliales activadas, de manera similar a como ocurre en el giro dentado de las muestras humanas.

Aun así, no todas las placas fibrilares y neuríticas de los pacientes de Alzheimer exhiben la capacidad de provocar respuesta microglial. De hecho, algunos individuos de estadio Braak V-VI presentan placas totalmente desprovistas de células microgliales, y aunque esta cuestión se discute más adelante, este hecho podría deberse a la pérdida de reactividad por parte del amiloide, aislado y cicatrizado por las células gliales, convirtiendo a la placa en una estructura más inerte.

4.2.3. Las células microgliales activadas no tienen un origen periférico

En los últimos años son numerosos los estudios que justifican la amplia respuesta microglial asociada a la patología amiloide que tiene lugar en los modelos animales de Alzheimer, con una entrada de monocitos y macrófagos periféricos que, una vez extravasados, pueden adquirir un fenotipo microglial e infiltrarse en el parénquima nervioso hasta alcanzar los depósitos extracelulares de A β (Jay et al. 2015; Butovsky et al. 2014). Incluso se ha demostrado en un modelo animal de encefalomielitis autoinmune (EAE) que son los monocitos infiltrados los que contribuyen a la progresión de la enfermedad y no la microglía residente (Ajami et al. 2011). Además, monocitos, macrófagos y microglía activada presentan una morfología y marcadores similares, por lo que existe una gran controversia en cuanto a la nomenclatura que define estas poblaciones y a los marcadores que deben emplearse para diferenciar la microglía de la población de células mieloides infiltradas (Ransohoff y Cardona 2010).

Además, el clásico marcador de microglía Iba1, empleado en este trabajo, es expresado también en las diferentes poblaciones de células mieloides pudiendo por consiguiente, marcar tanto microglía residente como macrófagos/monocitos infiltrados. Este posible origen periférico de la microglía se encuentra apoyado por el incremento con la edad en la inmunorreactividad, alrededor de las placas, del marcador CD45 (macrófagos^{high}/microglía^{low}) en nuestro modelo animal APP/PS1 y por la gran infiltración de linfocitos T (positivos para CD45 y CD3) en estos animales (este trabajo y Jimenez et al., 2008). Por otro lado, las muestras humanas Braak V-VI presentan un marcaje CD45^{medium} en la microglía reactiva que rodea las placas y, a diferencia de los ratones transgénicos, manifiestan una escasa infiltración de linfocitos T en el parénquima y una ligera acumulación a nivel perivascular de células CD45^{high} y MRC-1-positivas, indicando una limitada extravasación de macrófagos hacia el parénquima nervioso. A nivel molecular, los individuos Braak V-VI muestran

también un incremento en los niveles de expresión, medidos por RT-PCR, tanto de la quimiocina CCL2 (Navarro 2015), considerada señal de reclutamiento para monocitos, macrófagos y linfocitos (Bose y Cho 2013) como de su receptor CCR2 (Navarro 2015), marcador de macrófagos vasculares (Naert y Rivest 2012).

Por tanto, los datos obtenidos tanto en el modelo murino APP/PS1 como en los pacientes de Alzheimer son compatibles con el posible origen periférico de las células microgliales activadas que se asocian a las placas, tal y como demuestra el estudio de Jay y colaboradores (Jay et al. 2015).

Sin embargo, nuestro estudio cuantitativo de la expresión de ARNm de los marcadores de activación microglial llevado a cabo en muestras de hipocampo de ratones APP/PS1 de 18 meses de edad (con microglía y macrófagos) y en cultivos de microglía estimulada con LPS, en el que se obtiene un idéntico perfil CD45+/CCR2+/CX3CR1-/P2ry12- en ambos casos, demuestra que la microglía reactiva es capaz de imitar el perfil de expresión de los macrófagos periféricos. Además, cabe destacar en ambos casos el bajo nivel de expresión del receptor de fractalquina CX3CR1 en paralelo al aumento de CCR2, marcadores de microglía residente y macrófagos, respectivamente (Greter et al. 2015). Más aún, las células microgliales adultas estimuladas *in vitro* por LPS pierden la expresión del receptor purinérgico P2ry12, marcador también de microglía residente (Butovsky et al. 2014; Hickman et al. 2013; Chiu et al. 2013; Jay et al. 2015). Todos estos datos indican que los perfiles de activación que exhiben tanto los modelos transgénicos como los pacientes de Alzheimer pueden ser explicados por la activación microglial en ausencia de infiltración de macrófagos, en contra de lo que sugieren otros investigadores (Butovsky et al. 2014). Por tanto, nuestros datos cuestionan la idea actual de un origen periférico de la microglía activada en esta enfermedad neurodegenerativa y ponen de relieve la necesidad de identificar nuevos marcadores que permitan diferenciar específicamente a las células microgliales de los macrófagos periféricos.

4.2.4. Existe un marcado proceso degenerativo de la microglía en los pacientes, mientras que en modelos animales la microglía se activa y prolifera con el avance de patología.

En los últimos años son muchos los trabajos que han caracterizado un nuevo fenotipo microglial, distinto de la activación inflamatoria, relacionado con la disfunción de esta población: la microglía senescente o distrófica (revisado en Kettenmann, Kirchhoff, y Verkhratsky 2013; Mosher y Wyss-Coray, 2014; Streit, 2006; Streit et al., 2014). La disfunción de la microglía, que se reconoce morfológicamente por la atrofia del cuerpo celular y la pérdida/fragmentación de sus prolongaciones (citorrexis) ha sido relacionada tanto con el envejecimiento cerebral no patológico (Streit et al. 2004) así como con diversas enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (Eitzen et al. 1998), el síndrome de Down (Xue y Streit 2011) o la enfermedad de Alzheimer (Streit 2004). Además, desde que han sido identificadas determinadas mutaciones con pérdida de función en TREM2 (receptor de las células microgliales implicado en los procesos fagocíticos) como factor de riesgo para el Alzheimer (Neumann y Daly 2012; Guerreiro et al. 2013), adquiere más importancia la implicación de la senescencia microglial en el progreso de esta enfermedad.

En línea con esta nueva corriente y tras comprobar la leve activación microglial que se produce en el hipocampo y giro parahipocampal de los pacientes con patología tipo Alzheimer en comparación con nuestro modelo APP/PS1 (Jimenez et al. 2008; Moreno-Gonzalez et al. 2009) y otros modelos transgénicos de amiloidosis (Rodríguez et al. 2013) nos planteamos la posibilidad de que la microglía pudiera estar presentando un fenotipo disfuncional. En este sentido, el marcaje para Iba1 en el giro dentado de las muestras Braak V-VI presenta una menor inmunorreactividad en comparación con los individuos Braak II además de una redistribución espacial de las células microgliales, perdiendo de este modo la equidistancia mantenida entre sí por las células microgliales en estadios iniciales de la enfermedad. Estos resultados sugerentes de degeneración microglial en el giro dentado de los pacientes dementes fueron corroborados por una disminución significativa del porcentaje del área ocupada por las células microgliales en esta región. Además, el análisis de la distribución espacial de la población celular Iba1-positiva a lo largo de los estadios de Braak reveló que en el giro dentado de los pacientes de Alzheimer las células microgliales adoptan una distribución espacial heterogénea, con zonas aglomeradas relacionadas con las placas de A β , y zonas vacías en la que se pierde el “dominio espacial” asociado a cada célula microglial. Sin embargo, el recuento estereológico de la densidad (células/mm³) de células Iba1-positivas no proporcionó un resultado significativo de pérdida microglial en los individuos Braak V-VI, debido a la clara diferenciación de dos grupos en las muestras analizadas, en las que el 50% de los casos exhibe una severa disminución de la población microglial mientras que el otro 50% no varía su densidad numérica con respecto a los individuos de estadio leve Braak II (aunque sí presentan características morfológicas patológicas). Esto podría deberse a las diferencias en la duración temporal de la fase avanzada Braak V-VI de los pacientes, de modo que posiblemente aquellos individuos con una evolución clínica de demencia de mayor tiempo podrían ser los que exhiben una mayor degeneración microglial en el giro dentado ya que pudieron permanecer durante más tiempo expuestas al ambiente citotóxico y degenerativo generado por las formas tóxicas de A β y fosfo-tau y presentando de esta manera una mayor vulnerabilidad de estas células a los procesos que acompañan la patología y el propio envejecimiento cerebral. Al no disponer de los datos de la historia clínica de cada paciente, una de las principales limitaciones de nuestro estudio, no podemos afirmar esta suposición. Por ello, sería de gran interés repetir este estudio en muestras *post mortem* con historial clínico definido y en la actualidad nuestro grupo se encuentra gestionando la obtención de dichas muestras para el próximo proyecto (2016-2018) ya aprobado por el Instituto de Salud Carlos III.

Las células Iba1-positivas también se encuentran afectadas por un proceso degenerativo en la región CA3 de los pacientes de Alzheimer, ocupando una menor área inmunorreactiva significativa, redistribuyéndose espacialmente hacia las placas y exhibiendo características morfológicas típicas del fenotipo microglial senescente (Streit et al. 2004) como ocurre en el giro dentado. Sin embargo, en la región CA1 y en la corteza perirrinal del giro parahipocampal no se observaron cambios significativos en cuanto al área ocupada por estas células. Esta diferencias regionales en la vulnerabilidad microglial podría deberse a diferencias en la reactividad de las placas de A β sobre la microglía. Otro posible factor implicado en la degeneración microglial es la hipoxia, de tal forma que un ambiente más hipóxico en la región del giro dentado y CA3, por su situación anatómica y vascular, les

conferiría una gran vulnerabilidad a estas regiones afectando directamente a la supervivencia de las células microgliales y/o bien a su capacidad de proliferación. En relación a esto último, nuestros datos indican una escasa proliferación celular en las muestras humanas *post mortem*.

Se ha descrito que los pacientes con problemas de isquemia e infartos cerebrales en los que ocurren situaciones de hipoxia, son más susceptibles a padecer Alzheimer (revisado en Pendlebury y Rothwell 2009; Savva y Stephan 2010; Pendlebury 2012). En este sentido, diversas evidencias sugieren que la hipoxia promueve la patogénesis del Alzheimer (Zhang y Le 2010; Villarreal et al. 2014). Es más, se ha demostrado en modelos animales que la hipoxia aumenta los niveles de A β , induce la fosforilación de tau y provoca déficits cognitivos (Gao et al. 2013; Zhang et al. 2014). La hipoxia aumenta los niveles de BACE1, incrementado la vía amiloidogénica y la producción de A β , a través del factor inducible por hipoxia HIF1alfa (Zhang et al. 2007). Un aumento de los niveles de Hif1alfa en cerebro de modelos animales ha sido también descrito (Soucek et al. 2003). Datos preliminares del Dr. Vitorica indican un aumento de los niveles del factor HIF1alfa en nuestras muestras *post mortem* de Alzheimer. Todos estos datos apoyarían un posible papel de la hipoxia en la progresión de la patología. En la actualidad se están realizando estudios, en colaboración con otros grupos de investigación (Dr. A. Pascual y Dr. Vitorica del IBIS de Sevilla), para conocer el efecto de la hipoxia sobre la supervivencia microglial, *in vivo* e *in vitro*, y su repercusión sobre la patología del Alzheimer.

Por tanto, hasta el momento podríamos concluir que los enfermos de Alzheimer, a diferencia de los modelos transgénicos, presentan una ligera respuesta microglial, con escasos cambios morfológicos asociados al proceso de activación restringida a las placas de A β y que, en regiones como el giro dentado y CA3, tiene lugar además, un proceso de degeneración microglial acusado. Desconocemos las causas de esta menor reactividad/degeneración microglial en los pacientes, aunque nuestros estudios *in vitro* indican un papel tóxico selectivo sobre la microglía de las formas solubles de fosfo-tau (ver más adelante).

Hasta ahora se aceptaba la idea clásica incluida en la hipótesis de la cascada amiloide de que la microglía activada y reclutada por los depósitos amiloides, en un intento de fagocitar y eliminar el material agregado fibrilar e insoluble de las placas, secreta una serie de sustancias proinflamatorias y citotóxicas que contribuyen a la neurodegeneración (Rogers et al. 2002). Sin embargo, existen numerosos ejemplos en la bibliografía de células microgliales “activadas” en el interior o rodeando los depósitos de A β de los pacientes de Alzheimer cuya morfología se corresponde más bien con la de microglía senescente (Kaneko et al. 1989; Itagaki et al. 1989; Head et al. 2001). Además, han sido muchos los trabajos *in vitro* que han demostrado los efectos perjudiciales sobre la microglía tras la exposición con péptidos de A β y con placas aisladas de pacientes de Alzheimer (Korotzer et al. 1993; Flanary y Sammons 2007), incluso Krabbe y colaboradores han confirmado la disfunción fagocítica de la microglía asociada a la deposición de A β en dos modelos animales de Alzheimer (Krabbe et al. 2013). En esta línea, hemos advertido en algunos pacientes Braak V-VI áreas totalmente despobladas de microglía, incluso en regiones próximas a las placas, tanto en el giro dentado como en otras

regiones del hipocampo y del giro parahipocampal. Más aún, determinados depósitos de A β en estos pacientes presentan escasas células de microglía alrededor, las cuales además, exhiben características morfológicas patológicas. De forma similar, a nivel periférico se ha descrito que una respuesta inflamatoria defectuosa, incluyendo la muerte de macrófagos en fases tempranas, promueve la progresión y gravedad de las lesiones ateroscleróticas (Tabas 2010; Moore et al. 2013).

Podríamos deducir por consiguiente, que los depósitos amiloides, entre otros factores (revisado en Streit et al. 2014), contribuyen a la disfunción de la microglía en los enfermos de Alzheimer, de manera que las células microgliales, tras permanecer un tiempo activadas en un intento de fagocitar/compactar el A β , acaban degenerando contribuyendo así al aumento de la carga amiloide y al agravamiento de la patología.

Para profundizar en el estudio de la degeneración microglial y comprobar que la pérdida de células Iba1-positivas no se debe a una pérdida del fenotipo, se ha analizado otro marcador microglial, el receptor purinérgico P2ry12, que tras los estudios de expresión génica diferencial de la población de macrófagos y microglía, ha sido ampliamente reconocido como marcador de microglía adulta residente (Hickman et al. 2013; Butovsky et al. 2014; Chiu et al. 2013). Al igual que ocurre con la población de células Iba1-positivas, la microglía positiva para P2ry12 también se encuentra afectada por un proceso degenerativo en los pacientes de Alzheimer, de manera que el área ocupada por estas células es significativamente menor en las muestras Braak V-VI en comparación con los individuos de estadios leves y moderados, y esto ocurre en todas las regiones del hipocampo y del giro parahipocampal analizadas (giro dentado, CA3, CA1 y corteza perirrinal). Sin embargo, a diferencia de lo observado con el marcador de microglía general Iba1, las células P2ry12-positivas no se agregan alrededor de las placas en los pacientes dementes.

Para esclarecer este punto y comprobar que el marcador P2ry12 no se expresa en la microglía reactiva, se han llevado a cabo análisis de microscopía láser confocal. Efectivamente y como cabría esperar, hemos demostrado que las células microgliales reactivas asociadas íntimamente con las placas seniles presentan el fenotipo Iba1+/P2ry12-, de acuerdo con las recientes observaciones descritas por otros autores (Butovsky et al. 2014; Jay et al. 2015).

Así mismo, el análisis cuantitativo de los niveles de expresión de ARNm del receptor de fractalquina CX3CR1, marcador diferencial de microglía residente/quiescente (revisado en Greter et al. 2015), y de P2ry12 muestran también una disminución significativa en los pacientes Braak V-VI, en comparación con los controles y los individuos Braak II, apoyando de esta manera nuestros resultados inmunohistoquímicos. En línea con nuestros resultados de una reducida respuesta microglial en fases avanzadas de la enfermedad, una disminución en la expresión génica de citoquinas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias en individuos en estadios avanzados Braak V-VI en comparación con los estadios III-IV ha sido descrita (López-González et al. 2015).

La pérdida de homeostasis microglial podría promover y acelerar la patología del Alzheimer. En este sentido, se ha demostrado que la deficiencia de CX3CR1 (receptor acoplado a proteína G expresado exclusivamente en microglía y que media la comunicación neurona-microglía) acelera la

fosforilación y agregación de tau, así como el deterioro cognitivo en un modelo hTau (Bhaskar et al. 2010). Además, la deficiencia en este receptor microglial acelera la neurodegeneración en modelos animales de Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica (Cardona et al. 2006).

Las células microgliales degenerativas presentan alteraciones en el metabolismo del hierro, acumulando grandes cantidades de ferritina, una proteína transportadora del hierro. Es por ello que la ferritina ha sido usada de manera específica como marcador de microglía distrófica (Lopes et al. 2008), aunque su uso inmunohistoquímico ha sido siempre bien conocido como marcador general de microglía (Kaneko et al. 1989). En este sentido, nuestras muestras Braak V-VI presentan un abundante marcaje para ferritina en comparación con los individuos de estadios leves y moderados, si bien las regiones más afectadas son CA1 y subículo. Además, las células microgliales positivas para ferritina presentan, efectivamente, rasgos morfológicos senescentes, como era de esperar. El hecho de que el giro dentado de los pacientes dementes presente una menor inmunorreactividad para ferritina puede deberse a que las células microgliales de esta región hayan perdido completamente su funcionalidad, y que las que se encuentran en CA1 y subículo se hallen en etapas más tempranas de degeneración. En apoyo de nuestros datos, se ha descrito en muestras de pacientes con síndrome de Down (quienes desarrollan características histopatológicas tipo-Alzheimer) la existencia de una patología microglial acusada con pérdida de células microgliales y presencia de microglía distrófica positiva para ferritina (Xue y Streit 2011).

Sin embargo, la microglía asociada a las placas de A β también presenta una gran inmunorreactividad, al igual que ocurre en nuestro modelo APP/PS1, en el que la marca para ferritina se concentra alrededor de los depósitos extracelulares. Por consiguiente, podríamos determinar que el marcador de senescencia microglial ferritina se sobreexpresa también en la microglía reactiva que se encuentra asociada a las placas seniles, que podría explicarse por la asociación que existe entre la acumulación del hierro y la producción de especies reactivas de oxígeno, dependiente del hierro, durante la respuesta proinflamatoria (Recalcati y Locati, 2010).

Por tanto, podemos concluir que la población general de microglía, así como las células microgliales quiescentes, con fenotipo Iba1⁺/P2ry12⁺, exhiben una menor área inmunorreactiva, además de características morfológicas senescentes en el giro dentado de los pacientes de Alzheimer (Braak V-VI). Además, las células P2ry12-positivas también son vulnerables a este proceso degenerativo en CA1 y la corteza perirrinal. Estas diferencias entre ambas poblaciones pueden justificarse por el cambio de fenotipo por parte de las células quiescentes que, cuando se activan y migran hacia la placa, dejan de expresar el marcador P2ry12 y por consiguiente, disminuye la densidad de células inmunoteñidas en todas las regiones del hipocampo y giro parahipocampal. Además, lejos de lo que cabría esperar, como ya hemos demostrado, no se produce infiltración de monocitos/macrófagos vasculares ni proliferación microglial para reponer la pérdida de células microgliales en el parénquima interplaca.

En relación con esto último, el análisis de la expresión a nivel de proteína y ARNm del marcador de proliferación celular Ki67 a lo largo de los estadios de Braak muestra un pequeño aumento, no significativo, de proliferación, escaso para compensar la pérdida de las células

microgliales. A diferencia de lo que ocurre en modelos animales de la AD, en los que se ha descrito no solo aumento en la activación sino también en la proliferación microglial a lo largo de la patología (revisado en Gomez-Nicola y Perry, 2014). En apoyo a nuestros resultados, recientemente se ha descrito en la corteza temporal de pacientes de AD la existencia de activación microglial en ausencia de proliferación (Serrano-Pozo et al. 2013a).

En colaboración con el Dr. Vitorica, se ha determinado la toxicidad *in vitro* de las fracciones solubles S1 de hipocampo humano y del modelo APP/PS1 sobre células microgliales en cultivo, mediante citometría de flujo, para comprobar la vulnerabilidad de la microglía en los pacientes frente a la de los modelos animales. Se ha demostrado que la microglía sufre un proceso apoptótico tras el tratamiento con las fracciones S1 de pacientes en fases avanzadas Braak VI. En concreto, la inmunodepleción de la fracción S1 de individuos Braak V-VI para A β no modifica la viabilidad celular, sin embargo la inmunodepleción con el anticuerpo AT8 de la fracción S1 de individuos Braak V-VI bloquea el efecto tóxico de esta fracción soluble sobre la microglía. Sin embargo, el tratamiento en paralelo con las mismas fracciones S1 humanas de individuos Braak II y Braak V-VI utilizando una línea celular de astrocitos no muestra ningún efecto tóxico. Por otra parte, fracciones S1 equivalentes, obtenidas a partir de hipocampo de modelos APP/PS1 de 6 y 18 meses de edad, no muestran ningún efecto tóxico para la microglía Bv2. Estos datos por tanto, corroboran los resultados observados de degeneración microglial en el hipocampo y giro parahipocampal de pacientes de Alzheimer en contraposición con la extensa activación microglial mostrada por los ratones APP/PS1 durante la progresión de la enfermedad. Además, estos resultados sugieren que no se trata del péptido A β sino de tau hiperfosforilado el potencial agente tóxico responsable del declive microglial con la progresión de la enfermedad.

Teniendo en cuenta las evidencias que ponen de manifiesto la capacidad que poseen las células microgliales de moderar la patología amiloide por la función fagocítica y de compactación del A β , pudiéndose unir a oligómeros y fibras de A β , en conjunto con los recientes hallazgos de las variantes genéticas asociadas a factores de riesgo de la enfermedad de Alzheimer en genes microgliales que codifican proteínas implicadas en la eliminación del amiloide (TREM2, CD33 y CR1) (revisado en Heppner, Ransohoff, y Becher 2015), podemos afirmar que la senescencia microglial juega un papel relevante en la enfermedad de Alzheimer, con consecuencias deletéreas al no poder frenar la acumulación de las formas tóxicas de A β (Condello et al. 2015). La disfunción microglial, bien causada por alteraciones genéticas o por la prolongada exposición al ambiente citotóxico que provoca la acumulación de A β y/o la difusión de formas solubles de fosfo-tau, culmina finalmente en un estado distrófico, reconocido por las características morfológicas que adquieren las células (distrofia del cuerpo, fragmentación y pérdida de prolongaciones). Además, en este estado, la población microglial pierde su función fisiológica trófica y protectora sobre las neuronas, comprometiendo la integridad neuronal y contribuyendo de este modo a la neurodegeneración que tiene lugar en el curso de la enfermedad de Alzheimer. En línea con esta nueva corriente en la que se demuestra que la enfermedad de Alzheimer está relacionada con un proceso de disfunción microglial

más que con la activación de esta población, nuestro grupo de investigación ha llevado a cabo un estudio sobre el efecto de la inmunosupresión de la respuesta inmune innata (mediante tratamiento farmacológico con prednisona y ciclosporina) en la progresión de la patología que se desarrolla en el hipocampo de un ratón transgénico APP/PS1, obteniendo un incremento significativo en los niveles de A β (carga amiloide) y GFAP (reactividad astrocitaria), así como una disminución en los marcadores de interneuronas SOM y NPY (pérdida neuronal) (Navarro, 2015). También en apoyo a esta idea de que la disfunción microglial incrementa la patología tipo Alzheimer, experimentos recientes de nuestro grupo utilizando un modelo APP751SweLondonxIL-4(-/-) han revelado que la delección genética de IL-4 en este modelo de amiloidosis exacerba la deposición amiloide en el hipocampo 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, provocando su disfunción, y por tanto contribuir así a la acumulación extracelular de A β y el daño neuronal (Trujillo-Estrada, 2015). Recientemente, otros trabajos apoyan la idea de una disfunción microglial asociada a la progresión de la patología en modelos animales (Baron et al. 2014; Kan et al. 2015).

Hasta la fecha, las estrategias terapéuticas dirigidas a modular esta respuesta inflamatoria no han tenido éxito en los pacientes. Una posible explicación a este fracaso traslacional de los datos preclínicos en modelos a la clínica humana posiblemente se basa en la diferencia de la respuesta glial entre modelos y humanos. Nuestros resultados apuntan a que mientras en los modelos animales de AD la microglía se activa y prolifera de forma gradual al avance de las lesiones proteicas, en humanos existe una disfunción/degeneración de esta población. Por tanto, para generar modelos que mimeticen mejor la patología humana es necesario atenuar la respuesta microglial en dichos modelos. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha puesto en marcha un nuevo proyecto para abordar este objetivo, y para ello ratones transgénicos APP y/o tau serán sometidos a un tratamiento consistente en inhibir farmacológicamente el receptor CSF1r mediante la administración oral de GW2580 (LC Laboratories) con idea de inhibir la proliferación/supervivencia microglial (Gómez-Nicola et al. 2013), aunque es posible que la aproximación más eficiente consista en la ablación genética de la expresión de CSF1R específicamente en las células microgliales. Para ello, se cruzarán ratones *Csf1r fl/fl* (Jackson Lab.) y *Cx3cr1-cre* inducible por tamoxifeno. De esta forma, generaremos un *knockout* condicional específico de las células *Cx3cr1* positivas, principalmente (aunque no exclusivamente) microgliales. El ratón *Cx3cr1^{Cre}-Csf1r^{fl/fl}* será posteriormente cruzado con los modelos transgénicos APP o tau. De esta forma, dispondremos de un modelo de AD donde la supervivencia microglial puede ser disminuida a la edad elegida. Una vez realizados los tratamientos, o generados los modelos, los animales serán primero evaluados conductualmente y después se analizará la patología A β y/o tau, así como la degeneración neuronal a nivel molecular.

Finalmente, proponemos la necesidad de reevaluar la respuesta inflamatoria que tiene lugar en la enfermedad de Alzheimer considerando la existencia de una disfunción en la homeostasis microglial y sugerimos que los nuevos tratamientos y estrategias para combatir la enfermedad deben

ir encaminados al mantenimiento o al incremento de la función microglial, especialmente en las etapas avanzadas de la enfermedad.

4.2.5. Existe una marcada reactividad astrogliar asociada al A β en el hipocampo y giro parahipocampal de los pacientes de Alzheimer

La astrogliá, al igual que la microglía, juega también un importante papel en la respuesta inflamatoria que se desarrolla en la enfermedad de Alzheimer y, aunque su activación está relacionada con los depósitos de A β , todavía no se ha determinado el papel exacto que adquiere en esta patología. La activación de los astrocitos también es característica de la enfermedad de Alzheimer (Phillips et al. 2014; Heneka et al. 2015; Zhang y Jiang 2015); se manifiesta desde los primeros estadios de la enfermedad y progresa significativamente a medida que lo hace la patología amiloidea y tau. Los astrocitos reactivos pueden producir una gran batería de citoquinas proinflamatorias, contribuyendo a la función tóxica, aunque por otro lado, la astrogliá posee funciones protectoras liberando factores neurotróficos y ayudando a degradar el péptido β -amiloide (revisado en Avila-Muñoz y Arias 2014; Heppner, Ransohoff, y Becher 2015; Heneka et al., 2015; Verkhratsky et al., 2014; Phillips et al., 2014). De hecho, estudios preclínicos en modelos transgénicos han demostrado resultados contradictorios. La inhibición/depleción de alpha1 ACT (Mucke et al. 2000), calcineurina (Furman et al. 2012; Fernandez et al. 2012); CD40L (Tan et al. 2002), o TNF α (Green y LaFerla 2008) revierten la formación de placas y su toxicidad asociada, indicando que la activación de los astrocitos implica aumento de toxicidad. Por el contrario, la supresión de la expresión de GFAP/vimentina (Kraft et al. 2013), en vez de disminuir la patología neuronal la incrementa, produciendo un aumento en el número de neuritas distróficas alrededor de las placas. Estos últimos datos sugieren un papel neuroprotector.

Al igual que ocurre con la microglía, en nuestro modelo transgénico APP/PS1 tiene también lugar un proceso de astrogliosis desde edades tempranas que progresa con la edad, paralelamente a la acumulación extracelular del A β . Los astrocitos reactivos se localizan alrededor de las placas envolviéndolas y produciendo una gran cantidad de GFAP e iNOS en el hipocampo y la corteza entorrinal (Jimenez et al. 2008; Moreno-Gonzalez et al. 2009)

A diferencia de lo observado con la población microglial, los pacientes de estadio Braak V-VI muestran una elevada inmunotinción para GFAP en todas las regiones analizadas del hipocampo y giro parahipocampal en comparación con las muestras de individuos Braak II y Braak III-IV. En los pacientes de Alzheimer, además, los astrocitos reactivos, con el cuerpo celular y las prolongaciones hipertróficas, se localizan fundamentalmente asociados a las placas amiloides, como era de esperar. Además, al igual que sucede con las células microgliales, son los depósitos neuríticos (con distrofias AT8 positivas) los que provocan la reactividad en los astrocitos.

De nuevo, el giro dentado requiere una mención especial, ya que, a diferencia de otras regiones como CA1, CA3 y de la corteza perirrinal, donde la inmunoreactividad para GFAP es prácticamente indetectable en los estadios iniciales de la patología (Braak II), el giro dentado de

estos individuos en estadios leves presenta una alta densidad de células GFAP-positivas distribuidas además homogéneamente. Esta distribución homogénea se pierde con la aparición de las placas en el giro dentado en los individuos dementes (Braak V-VI). Además, la cuantificación del porcentaje ocupado por la población GFAP-positiva también muestra un incremento significativo en el giro dentado, y en las regiones CA1 y CA3 en los pacientes dementes en comparación con las muestras analizadas de los casos leves y moderados. Sin embargo, debido seguramente a la variabilidad de la patología amiloide que presenta el giro parahipocampal (que se desarrolla desde etapas tempranas), el área GFAP-positiva no muestra cambios en la corteza perirrinal a lo largo de los estadios de Braak.

Todos los astrocitos expresan GFAP, sin embargo, la cantidad de GFAP que presentan los astrocitos no reactivos en los estadios leves de la patología es prácticamente indetectable por la técnica inmunohistoquímica ya que se induce con la activación astrogial (excepto en regiones donde abundan los astrocitos fibrosos, como la sustancia blanca o, como ya hemos advertido, en el giro dentado). Los experimentos mediante microscopía láser confocal de doble inmunofluorescencia para GFAP y ALDH1L1, un marcador constitutivo de astrocitos (Serrano-Pozo et al. 2013a), muestra que ambos marcadores pueden ser detectados desde los estadios iniciales de la enfermedad, aunque los astrocitos reactivos exhiben una mayor cantidad de GFAP. Por tanto, el aumento de células GFAP-positivas en el hipocampo de los pacientes Braak V-VI parece ser debido a la activación astrogial y no a un proceso proliferativo, tal y como describe Serrano-Pozo et al. (2013) en pacientes de Alzheimer.

Tras demostrar la leve activación microglial que desarrollan nuestras muestras Braak V-VI en paralelo a una extensa activación astrogial (apoyada también por el aumento en los niveles de ARNm de GFAP medidos por RT-PCR), comprobamos además que el incremento observado en los niveles de expresión de la citoquina proinflamatoria TNF α en los pacientes de Alzheimer es producido por las células astrocitarias. Los resultados de la doble inmunotinción GFAP/TNF α e Iba1/TNF α revelan que son los astrocitos, y no la microglía, los encargados de producir esta citoquina potencialmente neurotóxica. Aunque clásicamente se le ha atribuido a la microglía la producción de TNF α , como ocurre además en nuestro modelo transgénico APP/PS1 (Jimenez et al. 2008) los astrocitos también tienen la capacidad de secretar esta citoquina en la respuesta inflamatoria (Heneka et al. 2010).

Sin embargo, los astrocitos también podrían tener un papel protector en los pacientes de Alzheimer. En este sentido, las imágenes de microscopía láser confocal muestran como los procesos astrocíticos envuelven por completo los depósitos amiloides neuríticos y los aíslan del parénquima nervioso o modo de cicatriz glial. A pesar de ello, las células GFAP-positivas no se infiltran en el interior de las placas de tipo clásico como sí lo hace la microglía, sino que actúan desde una posición más externa. Además, nuestro grupo de investigación ha demostrado recientemente el importante papel que desempeñan los astrocitos reactivos en el modelo APP/PS1 tras un tratamiento oral con litio, modulando las propiedades tóxicas de las placas, reduciendo la muerte neuronal y la formación de distrofias axonales asociadas a los depósitos (Trujillo-Estrada et al. 2013), funciones atribuidas a las células microgliales (Condello et al. 2015).

Por consiguiente, en las muestras humanas analizadas se produce una leve activación microglial, restringida a las placas de A β neuríticas (con las que se asocian íntimamente, probablemente en un intento de fagocitar/compactar el amiloide), a lo largo de la progresión de la patología de tau. Sin embargo, en los individuos dementes Braak V-VI, tiene lugar un proceso degenerativo que afecta a la población microglial, limitando su función en el aislamiento/aclaramiento del A β . En este momento, los astrocitos desarrollan una extensa respuesta inflamatoria en los pacientes de Alzheimer envolviendo por completo el A β , sin verse afectados por el ambiente senescente, produciendo además citoquinas proinflamatorias como TNF α .

Por otra parte, recientemente se ha sugerido que los astrocitos pueden desempeñar un papel relevante en el denominado “sistema glinfático” (Nedergaard 2013; Jessen et al. 2015), 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 por ejemplo A β evitando su acumulación. Dentro de este proceso, la localización específica de la acuaporina 4 en los pies perivascuales parece desempeñar un papel primordial (Iliff et al. 2012). La activación de los astrocitos en la patología de la AD podría deslocalizar la acuaporina 4, alterando o interrumpiendo dicho flujo. Por tanto, la activación de los astrocitos podría producir un aumento de toxicidad.

Con idea de determinar el potencial patológico de los astrocitos en la enfermedad de Alzheimer, nuestro grupo de investigación, junto con otros grupos nacionales (Dr. Vitorica, Dr. Comella y Dra. Galea) han iniciado un proyecto bajo la subvención de La Marató de TV3 para descifrar los perfiles funcionales de los astrocitos reactivos mediante diferentes aproximaciones experimentales.

Nuestros resultados demuestran que los modelos que sobreexpresan APP y desarrollan placas amiloides no mimetizan ciertos aspectos de la patología relacionada con la EA, especialmente la respuesta inflamatoria asociada a la microglía. El ambiente senescente que presentan los pacientes de Alzheimer, provocado por la liberación de especies tóxicas de A β y fosfo-tau, radicales libres, así como un fallo general en la maquinaria de degradación de proteínas acumuladas debido al propio envejecimiento, es probablemente el factor limitante en el estudio de la respuesta inflamatoria microglial en los modelos animales. Consideramos que en su conjunto estos resultados son novedosos, ya que hasta la fecha no se ha planteado un escenario de degeneración/disfunción microglial junto con una hiperactividad astrogliar como base del proceso neurodegenerativo y la demencia en los pacientes de Alzheimer. Este nuevo planteamiento daría respuesta a los continuos fracasos traslacionales y abriría una nueva vía para el diseño de estrategias terapéuticas útiles para retrasar el avance del Alzheimer actuando en las fases iniciales de la enfermedad y dirigidas a modular/prevenir la disfunción glial.

4.3. EL PROCESO NEURODEGENERATIVO AFECTA SEVERAMENTE A LAS INTERNEURONAS SOM Y PV EN LOS PACIENTES, MIENTRAS QUE EN EL MODELO APP/PS1 MUESTRAN UNA VULNERABILIDAD DIFERENCIAL

4.3.1. Las interneuronas SOM se encuentran gravemente afectadas en los pacientes Braak V-VI así como en el modelo transgénico APP/PS1

La muerte neuronal es una de las principales características histopatológicas de la enfermedad de Alzheimer, y junto con la pérdida sináptica, lo que mejor se correlaciona con la pérdida de memoria. Dentro del lóbulo temporal medial, el hipocampo y la corteza entorrinal de los pacientes de AD sufren un grave proceso de pérdida neuronal (Gomez-Isla et al. 1996; West et al. 2004; Gunten et al. 2006). Sin embargo, muchos modelos animales de esta patología no desarrollan muerte neuronal y, si lo hacen, es limitada y aparece a edades muy avanzadas. Estudios previos de nuestro grupo de investigación en el modelo APP_{751SL}/PS1_{M146L} han demostrado una pérdida significativa y selectiva de interneuronas que expresan los neuropéptidos somatostatina (SOM) y neuropéptido Y (NPY) en el hipocampo y en la corteza entorrinal de estos animales desde los 6 meses de edad (Ramos et al. 2006; Moreno-Gonzalez et al. 2009). Además, en el subículo de este modelo (región fundamental en la integración de información entre el hipocampo y la corteza entorrinal) la pérdida de interneuronas SOM tiene lugar a partir de los 4 meses de edad, siendo la región que se encuentra más afectada por la muerte neuronal temprana (Trujillo-Estrada et al. 2014).

Existe una pérdida significativa de interneuronas SOM-positivas en el hipocampo y corteza perirrinal de los pacientes de Alzheimer

Puesto que las interneuronas juegan un papel crucial controlando la excitabilidad de las neuronas principales y manteniendo un equilibrio funcional entre los circuitos neuronales (revisado en Kepecs y Fishell, 2014), en el presente trabajo, y con el propósito de validar los resultados obtenidos en modelos animales, hemos analizado la vulnerabilidad de la población de células SOM-positivas en las muestras humanas durante la progresión de la enfermedad. Nuestros datos cuantitativos mediante estereología indican que tanto el giro dentado del hipocampo como la corteza perirrinal del giro parahipocamapal de los pacientes de Alzheimer sufren una disminución muy significativa de la densidad (células/mm³) de la población de interneuronas que expresan somatostatina, en comparación con los individuos que se encuentran en estadios leves Braak II. Es de destacar que la corteza perirrinal de los individuos de estadio moderado Braak III-IV también muestra una reducción significativa de esta población neuronal. Además, a nivel cualitativo la región CA1 del hipocampo de las muestras humanas Braak V-VI también exhibe una disminución evidente de la cantidad de cuerpos SOM-positivos (células O-LM).

Además, los pacientes de Alzheimer (Braak V-VI) muestran una reducción generalizada del plexo axonal positivo para SOM en todas las regiones estudiadas del hipocampo y giro parahipocampal, en comparación con los individuos de estadio leve (Braak II) y moderado (Braak III-IV) de la patología. Cabe señalar especialmente la grave patología neurítica del giro dentado de los pacientes de Alzheimer. Esta región muestra una elevada cantidad de neuritas distróficas de enormes dimensiones, inmunopositivas para somatostatina y asociadas a las placas de A β , que no es comparable con ninguna otra región analizada de las muestras Braak V-VI. El tipo de A β fibrilar que se forma en el giro dentado, específico de esta región, así como el ambiente senescente que provoca la disfunción de las células microgliales y la propia degeneración de la microglía podría provocar la formación de estas neuritas aberrantes en la población neuronal SOM-positiva. En relación a esto último, recientemente se ha demostrado en modelos animales de AD que las áreas de las placas de A β descubiertas de microglía presentan una mayor cantidad de distrofias neuríticas (Condello et al. 2015).

Esta disminución de la población neuronal SOM-positiva en los pacientes, determinada mediante técnicas inmunohistoquímica y estereológicas, ha sido corroborada también mediante RT-PCR en las mismas muestras humanas en colaboración con el Dr. Vitorica. En concreto se ha determinado una bajada muy significativa de los niveles de ARNm de SOM y NPY (neuropéptido que colocaliza con SOM en la misma población celular) en el hipocampo de los individuos Braak V-VI.

Nuestros datos son consistentes con estudios previos en humanos que muestran una disminución de SOM en pacientes de Alzheimer (revisado en Burgos-Ramos et al. 2008) (revisado en Burgos-Ramos et al., 2008). Así, se ha descrito que este neuropéptido sufre una disminución muy notable, tanto en líquido cefalorraquídeo como en el cerebro (Arai et al. 1984; Gaspar et al. 1989; Reinikainen et al. 1987; Grouselle et al. 1998; Kumar 2005a; Epelbaum et al. 2009) habiéndose descrito la pérdida de interneuronas, mediante estudios cuantitativos no basados en estereología en regiones neocorticales cerebrales como posible causa de la disminución en los niveles de este neuropéptido (Beal et al. 1986; Gaspar et al. 1989; Kumar 2005b). También, se ha descrito una disminución por RT-PCR de SOM y sus receptores en el lóbulo temporal de pacientes de Alzheimer (Gahete et al. 2010).

Por lo tanto, nuestros datos, obtenidos mediante técnicas cuantitativas de recuento estereológico, demuestran en el hipocampo y giro parahipocampal (corteza perirrinal) de los pacientes de Alzheimer un proceso degenerativo severo de las neuronas SOM-positivas. El significado funcional de esta pérdida de interneuronas se discute más adelante.

En las capas profundas de la corteza perirrinal del modelo APP/PS1 tiene lugar una pérdida de neuronas SOM-positivas que coincide temporal y espacialmente con la acumulación extracelular de A β

La corteza perirrinal presenta una gran importancia por sus conexiones recíprocas con la corteza entorrinal y por su papel en el flujo de información entre el lóbulo temporal medial y áreas neocorticales (revisado en Suzuki y Naya, 2014), y además es una de las primeras regiones afectadas

por las lesiones proteicas en los pacientes de Alzheimer (presente trabajo; Braak y Braak 1991; Braak et al. 2006). Por este motivo, y tras demostrar la pérdida de neuronas SOM-positivas en la corteza perirrinal de los pacientes de Alzheimer (Braak V-VI), hemos analizado la corteza perirrinal del modelo APP/PS1, un área no estudiada previamente, para validar los resultados obtenidos en los pacientes y añadir nuevas evidencias de la utilidad predictiva de este modelo transgénico.

Nuestros resultados muestran claramente una pérdida significativa de la densidad (células/mm³) de neuronas SOM-positivas en la corteza perirrinal del modelo APP/PS1, al igual que sucede en el hipocampo propio, corteza entorrinal y subículo de este animal transgénico (Ramos et al. 2006; Moreno-Gonzalez et al. 2009; Trujillo-Estrada et al. 2014). Esta disminución del número de neuronas SOM se observa desde los 6 meses de edad, y afecta principalmente a las células localizadas en las capas más profundas (IV-VI), donde los depósitos de A β aparecen antes y son de mayor tamaño. La disminución de esta población no sigue progresando con la edad, lo que indica que las interneuronas GABAérgicas que expresan somatostatina no forman una población homogénea y que existen, al menos: 1) una subpoblación resistente localizada en las capas superficiales y 2) una subpoblación altamente vulnerable y otra resistente al proceso neurodegenerativo en las capas profundas.

Además, se han encontrado neuritas distróficas inmunopositivas para SOM a edades tempranas, fundamentalmente asociadas a los depósitos de A β . La presencia de estas neuritas distróficas SOM-positivas en la corteza perirrinal, y la existencia de una pérdida de neuronas NeuN-positivas en los estudios de doble marcaje SOM/NeuN realizados en la corteza entorrinal de este modelo (Moreno-Gonzalez et al. 2009), indican que la disminución en la densidad de somas SOM-positivos no se debe a un proceso de hipofuncionalidad neuronal (pérdida del fenotipo SOM), sino que existe un proceso neurodegenerativo que afecta a esta población.

La base de esta heterogeneidad en la población que expresa SOM (vulnerable vs resistente) podría residir en múltiples aspectos, por ejemplo, Ma y colaboradores (2006) proponen en su trabajo que la existencia de diferentes tipos de células SOM-positivas en cuanto a sus propiedades neuroquímicas, morfológicas o electrofisiológicas, así como en su distribución en la columna cortical, pueden determinar dicha variabilidad. En esta línea, se realizó un estudio de colocalización con la sintasa de óxido nítrico neuronal, nNOS, para determinar qué subpoblación de neuronas SOM-positivas es la más vulnerable de la patología en este modelo animal. Tal y como demostramos en este trabajo, existe una colocalización del 100% entre nNOS y SOM en la población de las neuronas nitrérgicas, a todas las edades y en los genotipos analizados (APP/PS1 y WT). Puesto que hay más neuronas SOM-positivas que neuronas nitrérgicas, nuestros datos indican que las neuronas nNOS se corresponden con una subpoblación de neuronas SOM-positivas en la corteza perirrinal. Además, el recuento estereológico en las capas profundas de la corteza perirrinal no mostró cambios significativos relacionados con la edad en el número de neuronas nNOS en la corteza perirrinal de los ratones APP/PS1 ni de los animales WT. Por lo tanto, podemos determinar que la población de interneuronas nNOS de las capas profundas de la corteza perirrinal es una subpoblación de interneuronas somatostatina resistente al proceso neurodegenerativo.

Está descrita la existencia de co-localización de SOM con diferentes proteínas ligadoras de calcio, como calretinina (CR) o calbindina (CB) (revisado en Markram et al. 2004), lo que le puede conferir a estas poblaciones de interneuronas cierta resistencia a la degeneración, al tamponar los niveles de calcio intracelular, que pueden verse afectados por el efecto del péptido β -amiloide (Ferreiro et al. 2008). Para determinar esto y comprobar que la población de células SOM-positivas resistente es aquella que expresa alguna proteína ligadora de calcio, serían necesarios estudios de doble marcaje SOM/CB y SOM/CR en la corteza perirrinal de nuestro modelo. Sin embargo, en el hipocampo de este modelo transgénico existe una pérdida considerable de interneuronas CR-positivas (Baglietto-Vargas et al. 2010), por lo que la CR no parece conferir un fenotipo altamente protector. No tenemos datos respecto a la expresión de CB en nuestro modelo, por lo que sería interesante analizar esta población neuronal en futuros experimentos. La coexpresión de SOM junto con NPY también puede otorgar más vulnerabilidad a unas interneuronas que a otras (Gaspar et al. 1989). Además, las interneuronas que expresan NPY también pueden coexpresar CR, con o sin coexpresión de SOM (Gonchar et al. 2007). En nuestro modelo animal, se ha demostrado que tanto en el hipocampo como en la corteza entorrinal no solo las interneuronas SOM son vulnerables, sino también la población que expresa NPY (Ramos et al. 2006; Moreno-Gonzalez et al. 2009).

En paralelo al proceso neurodegenerativo que tiene lugar en las capas profundas de la corteza perirrinal, también se observa una acumulación extracelular del péptido $A\beta$ desde edades tempranas preferencialmente en estas capas. De forma similar, se ha observado una correlación espacial entre la pérdida de neuronas SOM y un mayor presencia de placas de $A\beta$ en otras regiones de este modelo APP/PS1 como el hipocampo propio (Ramos et al. 2006), subículo (Trujillo-Estrada et al. 2014) y corteza entorrinal (Moreno-Gonzalez et al. 2009). Nuestra propuesta del $A\beta$ extracelular como probable agente tóxico para las neuronas SOM se discute con más detalle en el siguiente apartado.

El $A\beta$ extracelular es el principal factor implicado en la degeneración de las neuronas SOM en el modelo APP/PS1

Actualmente se desconocen los mecanismos que subyacen a la muerte de las interneuronas SOM en pacientes de Alzheimer o modelos de la enfermedad, pero tal y como hemos sugerido previamente (Moreno-Gonzalez et al. 2009; Jiménez et al. 2011; Trujillo-Estrada et al. 2014), el $A\beta$ extracelular podría ser un factor principal. En este modelo animal, como demuestran las dobles marcajes SOM/APP, las interneuronas SOM no expresan el gen humano mutado APP y por tanto no producen/acumulan $A\beta$ intracelular, descartándose este hecho como la posible causa de su toxicidad selectiva. Así, la pérdida de estas neuronas inhibitorias parece estar íntimamente asociada con la aparición temporal y espacial de los depósitos de $A\beta$ en la corteza perirrinal del modelo APP/PS1. El estudio del patrón de distribución espacio temporal de las diferentes formas de $A\beta$ ($A\beta_{42}$ y $A\beta$ fibrilar) ha demostrado que los primeros depósitos extracelulares amiloides se generan a partir de los 3-4 meses de edad y se localizan, principalmente, en las capas profundas de la corteza perirrinal.

Además, los depósitos de A β fibrilar (positivos para TioS) aumentan significativamente, en número y tamaño, durante el envejecimiento, sobretodo, entre los 6 y los 12 meses de edad, coincidiendo espacial y temporalmente con la muerte de interneuronas SOM-positivas. La formación preferente de depósitos extracelulares en estas capas, posiblemente, comprometa la supervivencia neuronal y sea, al menos en parte, responsable de la degeneración y muerte neuronal que ocurre en las capas profundas de la corteza perirrinal de este modelo animal. Esta correlación entre muerte de neuronas SOM-positivas y presencia de abundantes depósitos de amiloide ha sido mostrada en estudios previos con este mismo modelo (Moreno-Gonzalez et al. 2009; Jiménez et al. 2011; Trujillo-Estrada et al. 2014), y también la relación contraria, como la que ocurre en regiones corticales con una menor carga amiloide, como por ejemplo la corteza auditiva, que muestran un menor porcentaje de pérdida de neuronas SOM-positivas (Moreno-Gonzalez et al. 2009); o incluso la región rostral del estriado, con escasos o ningún depósito amiloide, que no muestra cambios en la densidad de interneuronas SOM-positivas (Ramos et al. 2006). Esta correlación entre la muerte celular y la deposición extracelular de A β se ha observado también en otros modelos de la AD, en los que existe una relación espacial entre la formación de placas, la activación astrocitaria y microglial y la muerte neuronal; en estos casos, la muerte neuronal únicamente sucede en las zonas donde existe depósito amiloide (Howlett et al.). Por lo tanto, las placas o el A β oligomérico liberado a partir de ellas, pueden contribuir significativamente al proceso neurodegenerativo en nuestro modelo transgénico.

No podemos descartar, sin embargo, otras causas distintas del A β para la muerte de las neuronas SOM, ya que se sabe que estas interneuronas son especialmente vulnerables y se ven afectadas también en enfermedades como la epilepsia (Riekkinen y Pitkänen 1990; Robbins et al. 1991), en el traumatismo cerebral (Lowenstein et al. 1992) o la isquemia cerebral (Johansen et al. 1987).

No se conocen las causas específicas de la gran susceptibilidad al daño que tiene esta subpoblación de interneuronas GABAérgicas, pero la sobreexcitación de estas células podría estar implicada en algunos casos. En este sentido, se ha señalado que las neuronas SOM del hipocampo presentan una alta densidad de receptores para glutamato de tipo NMDA (Nyíri et al. 2003) (Nyiri et al., 2003), que están implicados en mecanismos de excitotoxicidad. En este escenario, un aumento de la excitabilidad de las neuronas glutamatérgicas, por ejemplo en respuesta al A β , y la consiguiente sobreactivación de los receptores NMDA de las neuronas SOM podría estar en la base del proceso neurodegenerativo.

La pérdida de las interneuronas SOM-positivas en el hipocampo y la corteza perirrinal podría estar asociada al declive cognitivo que acompaña a esta enfermedad

La corteza perirrinal, al igual que el hipocampo, es un componente imprescindible dentro del sistema de memoria del lóbulo temporal medial. Varios estudios en primates no humanos y en humanos han demostrado que no solo el hipocampo es importante en los procesos de memoria, sino

que la corteza perirrinal juega también un papel crítico en la formación de recuerdos (Squire 2004; Buckley 2005; Murray et al. 2005; Haskins et al. 2008; Aminoff et al. 2013; Suzuki y Naya 2014).

El neuropéptido somatostatina modula la neurotransmisión, la secreción y la proliferación celular (Epelbaum et al. 1994; Patel 1999), además de la actividad motora y las funciones cognitivas (Viollet et al. 2008; Kluge et al. 2008; Einstein et al. 2010). Los primeros estudios sobre las funciones de este neuropéptido en el SNC se basaron en su administración intraventricular, comprobándose que mejoraba el aprendizaje; mientras que las inyecciones de cisteamina (un componente relacionado con la disminución de somatostatina) inducían déficits de memoria (ver revisión Epelbaum et al. 2009). Además, el sistema somatostatinérgico juega un papel esencial en la adquisición de memoria contextual (Kluge et al. 2008) y en la memoria de reconocimiento (Einstein et al. 2010).

Un tipo celular importante dentro de las interneuronas SOM-positivas corticales son las denominadas células de Martinotti (Kawaguchi y Kondo 2002; Druga 2009; DeFelipe et al. 2013). Las células de Martinotti son inhibitoras e intervienen en la coordinación entre las distintas capas y columnas corticales (Wang et al. 2004), por lo que su neurodegeneración temprana podría implicar una sobre-excitación de las neuronas principales a las que inervan, generando fallos cognitivos en los procesos de memoria y aprendizaje que modulan las neuronas, al menos en la corteza perirrinal.

Más aún, la somatostatina regula la actividad de la enzima neprilisina, una endopeptidasa con capacidad de degradar el A β en el cerebro. La expresión de neprilisina disminuye durante el envejecimiento (Saito et al. 2005), favoreciendo el incremento de depósitos de A β en sujetos de edad avanzada (Iwata et al. 2002). Por lo tanto, una disminución de los niveles de SOM, durante el envejecimiento o durante una situación patológica como la AD, induciría una disminución en la actividad de la neprilisina 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.

Por tanto, los cambios en la señalización mediada por SOM (disminución de los niveles por pérdida neuronal) en regiones como la corteza perirrinal, corteza entorrinal e hipocampo posiblemente estén implicados en los fallos cognitivos tempranos observados en modelos animales y en pacientes de la enfermedad de Alzheimer (Matsuoka et al. 1995). En este sentido, nuestro grupo ha determinado que existen alteraciones cognitivas tempranas en el modelo APP/PS1 utilizando diversas pruebas conductuales, empleadas rutinariamente en roedores, para determinar memoria hipocampal y cortical, como son las pruebas de reconocimiento de objetos, contexto, lugar y laberinto acuático de Morris.

Finalmente, podemos determinar que tanto en el hipocampo y corteza perirrinal de los pacientes de Alzheimer, como en las capas profundas de la corteza perirrinal de los ratones

transgénicos APP/PS1 tiene lugar un proceso de degeneración neuronal que afecta a la población de interneuronas que expresan el neuropéptido somatostatina. Aunque las causas de la muerte están aún por determinar, sugerimos que, puesto que los pacientes de Alzheimer y nuestro modelo presentan respuestas inflamatorias distintas (con degeneración microglial en los humanos y una exacerbada activación en el modelo animal) y dado que los ratones APP/PS1 no desarrollan cambios neurofibrilares, las formas tóxicas de A β (presentes en ambos casos) son las principales responsables de la muerte neuronal, especialmente en el modelo animal en el que la deposición extracelular de amiloide coincide espacial y temporalmente con la degeneración de las células SOM-positivas.

4.3.2. Las interneuronas PV son muy sensibles al proceso degenerativo en los pacientes, mientras que en los ratones APP/PS1 esta población GABAérgica es resistente al progreso de la patología

Las interneuronas PV-positivas son muy vulnerables en el hipocampo y la corteza perirrinal de los pacientes de Alzheimer

Las neuronas que expresan la proteína ligadora de calcio parvalbúmina (PV), junto con las que producen SOM, representan la población mayoritaria de interneuronas GABAérgicas corticales (Wonders y Anderson 2005). Se corresponden con un grupo neuronal de gran importancia en el hipocampo y giro parahipocampal al participar en la inhibición perisomática (células en cesto) y de las porciones iniciales de los axones (células en candelabro) de las neuronas glutamatérgicas, manteniendo de este modo el equilibrio excitatorio de los circuitos sinápticos (revisado en Markram et al., 2004; Kepecs y Fishell, 2014). De hecho, la pérdida de neuronas PV-positivas está relacionada con el desarrollo de la epilepsia (DeFelipe 1999) así como con el trastorno bipolar de tipo I y la esquizofrenia (Wang et al. 2011).

Hemos analizado también la vulnerabilidad de esta subpoblación GABAérgica en las muestras humanas durante la progresión de la enfermedad. Mediante estudios inmunohistoquímicos y recuento estereológico, demostramos que en los pacientes de Alzheimer tiene lugar un proceso neurodegenerativo que afecta a las interneuronas que expresan PV. La región CA1 del hipocampo así como la corteza perirrinal del giro parahipocampal manifiestan una marcada disminución significativa en la densidad de somas neuronales PV-positivos en los individuos de estadio Braak V-VI, en comparación con aquellos de estadio leve Braak II. Cabe destacar la notable disminución de neuronas PV-positivas, mediante observación cualitativamente, que hemos detectado en el hilio del giro dentado así como de axones perisomáticos inmunomarcados en la capa granular. Aunque esta población de interneuronas desarrolla escasas neuritas distróficas, a diferencia de lo que sucede con las células que producen SOM, el plexo axonal inmunorreactivo para PV exhibe una marcada reducción en todas las regiones analizadas de los enfermos de Alzheimer, en comparación con los casos no dementes. Además, estos datos han sido corroborados a nivel de expresión de ARNm gracias a la colaboración del Dr. Javier Vitorica, determinando una disminución significativa en los niveles de PV en el hipocampo y giro parahipocampal incluso desde estadios moderados Braak III-IV (Navarro, 2015). Sin embargo, esta subpoblación es resistente a los cambios neurofibrilares

provocados por la agregación de fosfo-tau tal y como demuestra el estudio doble inmunofluorescente para PV y tau-46.

Existen datos contradictorios en relación con la vulnerabilidad de las neuronas PV en los pacientes de Alzheimer. Mientras que algunos estudios indican que las neuronas PV son resistentes a la patología de la AD (Ferrer et al. 1991, 1993; Hof et al. 1991; Sampson et al. 1997; Leuba et al. 1998), otros muestran una pérdida significativa de estas neuronas tanto en el hipocampo como en la corteza (Solodkin et al. 1996; Brady y Mufson 1997; Mikkonen et al. 1999; Takahashi et al. 2010). Incluso en alguno de estos estudios, además, se observaron alteraciones morfológicas de las neuronas PV y pérdida de los plexos axonales perisomáticos (Mikkonen et al. 1999). Los diferentes procedimientos experimentales (retraso en la fijación o procesamiento de la muestra de tejido *post mortem*) o diferencias en la patología de los individuos con Alzheimer, podrían explicar estos resultados contradictorios. Alternativamente, diferencias en los circuitos intrínsecos/extrínsecos regionales, o la existencia de distintos ambientes tóxicos podrían ser responsables de estas diferencias.

En cualquier caso, parece ser que esta subpoblación de interneuronas de la corteza perirrinal es bastante vulnerable en los pacientes de Alzheimer. Sin embargo, podemos decir que al no desarrollar distrofias neuríticas asociadas a las placas de A β , ni cambios asociados a tau (Blazquez-Llorca et al. 2010), las neuronas que contienen PV son, en cierta, medida más resistentes a la patología en comparación con la subpoblación que expresa somatostatina. En este mismo sentido están los datos de Solodkin y colaboradores (Solodkin et al. 1996), que observan una disminución de la inmunorreactividad para la PV en la corteza entorrinal de los individuos con Alzheimer, pero que no se correlaciona con la formación de los ovillos neurofibrilares.

La parvalbúmina es una proteína ligadora de calcio, y como tal, es capaz de tamponar la concentración de calcio intracelular y mantener así la homeostasis celular. Además, el calcio participa en funciones tan sumamente importantes dentro de las neuronas como son el crecimiento neurítico, la transmisión sináptica o la supervivencia celular, y es por ello que muchas enfermedades neurodegenerativas cursan con fallos en la homeostasis de calcio (ver revisión Mattson 2007).

También es sabido el papel crucial que desempeñan las interneuronas PV-positivas en la generación de las oscilaciones gamma en el hipocampo (Lewis et al. 2005), implicadas en la codificación de la nueva información y en el almacenamiento de la memoria (Buzsáki 2001). Por tanto, la pérdida de esta población neuronal en regiones tan vulnerables como el hipocampo o la corteza perirrinal podría estar relacionada con los déficits cognitivos que sufren los pacientes de AD. Las posibles causas que originan esta pérdida de neuronas PV se discuten en el siguiente apartado.

Las interneuronas PV-positivas de la corteza perirrinal del modelo APP/PS1 son resistentes al progreso de la patología a diferencia de lo observado en pacientes

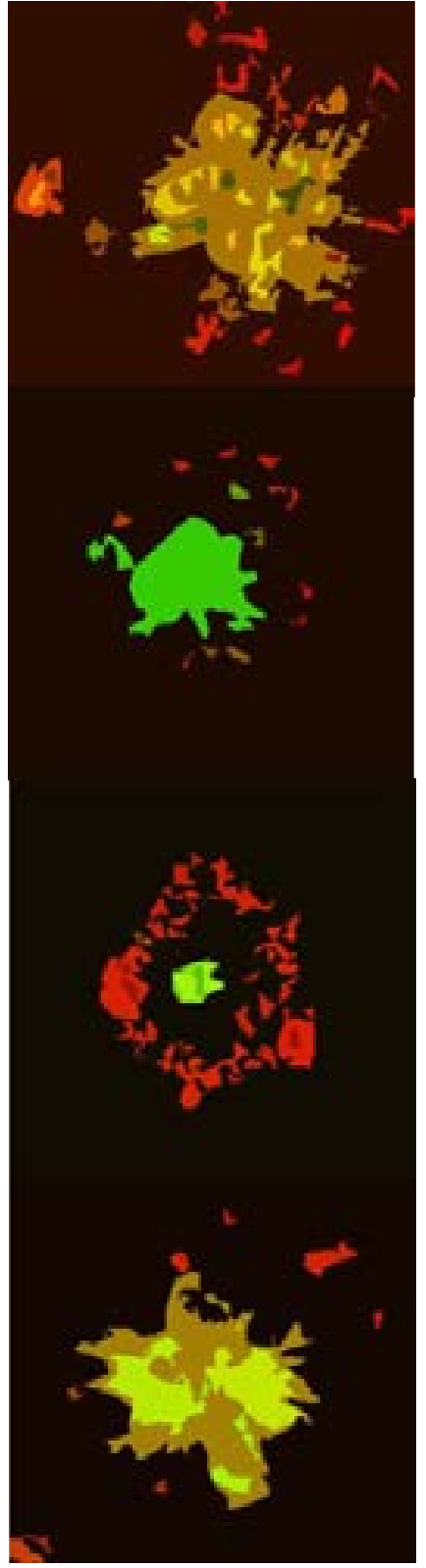
El estudio inmunohistoquímico así como el recuento estereológico de esta población neuronal en el modelo APP/PS1, y a diferencia de lo observado en pacientes, no revela cambios en la densidad numérica de las neuronas PV-positivas en ninguna de las dos áreas de la corteza perirrinal analizadas (áreas 35 y 36) a las distintas edades (6 y 18 meses). Además, tampoco aparecen neuritas distróficas PV-positivas alrededor de los depósitos de A β ni siquiera a la avanzada edad de 18 meses. Resultados similares han sido documentados previamente por nuestro grupo de investigación en otras regiones cerebrales de este modelo animal como son el hipocampo (Ramos et al. 2006), corteza entorrinal (Moreno-Gonzalez et al. 2009) e incluso en el subículo, en donde la patología amiloide se desarrolla de manera más severa y temprana (Trujillo-Estrada et al. 2014).

Por consiguiente, la ausencia de neuritas distróficas y de cambios en la densidad neuronal parece indicar que esta población de interneuronas presenta un fenotipo muy resistente a los procesos neurodegenerativos asociados al A β que tienen lugar en estos ratones transgénicos y, por lo tanto, no mimetiza la pérdida de interneuronas parvalbúmina positivas ocurrida tanto en el hipocampo como en la corteza perirrinal de los pacientes de Alzheimer.

Por otro lado, también hemos demostrado en este trabajo, mediante estudios *in vitro*, la resistencia de esta subpoblación neuronal a la presencia de las formas tóxicas solubles de A β (contenidas en la fracción soluble S1) procedentes del hipocampo de los ratones APP/PS1, lo que apoya firmemente los datos inmunohistoquímicos obtenidos. En la actualidad, se están llevando a cabo experimentos para comprobar si las fracciones solubles procedentes de pacientes de Alzheimer son tóxicas para las neuronas que contienen PV al fin de determinar si son las formas solubles de fosfo-tau el factor causante de la muerte de esta subpoblación en las muestras humanas. Esta idea se apoya en el hecho de que existe acumulación de formas solubles de tau hiperfosforiladas en el medio extracelular en estos pacientes, a diferencia de los modelos APP/PS1. En este sentido, un estudio reciente ha demostrado la pérdida de interneuronas PV-positivas en un modelo Tau (Levenga et al. 2013). Por otra parte, no podemos descartar otras posibles causas que justifiquen la mayor vulnerabilidad de esta población en humanos, como puede ser la pérdida de homeostasis glial y las propiedades intrínsecas relativas a la propia neurona, cuya naturaleza y sensibilidad al daño pueden variar entre las diferentes especies.

5. Conclusiones

Conclusions



1. La patología asociada a fosfo-tau es mucho más prominente que la patología amiloide en el hipocampo y giro parahipocampal de los pacientes de Alzheimer. Los cambios neurofibrilares degenerativos siguen el patrón topográfico de los estadios de Braak, con afectación del hipocampo en fases iniciales. Sin embargo, la patología amiloide presenta un patrón regional muy variable y alcanza al hipocampo solo en las fases más avanzadas. Los altos niveles de fosfo-tau en contraste con el bajo contenido de $A\beta$ en la fracción soluble sugiere que las formas solubles de fosfo-tau podrían desencadenar el proceso neurodegenerativo en humanos.
2. La patología amiloide muestra una marcada variabilidad regional en los pacientes, con formación de placas fibrilares y neuríticas en el giro dentado, placas clásicas en CA1 y corteza del giro parahipocampal, y placas difusas únicamente en esta última región, lo que sugiere distintos orígenes o patrones de progresión de estos depósitos. Estos datos difieren de observado en los modelos APP/PS1 donde las placas amiloides son todas de naturaleza neurítica, poniendo de manifiesto la escasa reproducibilidad en estos modelos animales del proceso de amiloidosis que tiene lugar en los pacientes. Caracterizar la evolución de la patología en muestras de pacientes es clave para mejorar y validar el uso de modelos animales en la experimentación preclínica.
3. En los pacientes de Alzheimer tiene lugar una limitada activación microglial asociada a las placas amiloides, y aún más relevante, un notable proceso degenerativo de la microglía en fases avanzadas de la enfermedad. Esta respuesta microglial en los pacientes contrasta claramente con lo observado en modelos APP/PS1, donde la microglía se activa y prolifera de forma gradual con el desarrollo de la patología. Por tanto, el concepto clásico de una respuesta microglial citotóxica asociada a esta patología debe ser reevaluado, hecho que se ve reforzado por el fracaso terapéutico de las estrategias anti-inflamatorias probadas hasta la fecha en pacientes. Prevenir la disfunción/degeneración microglial podría constituir una novedosa y potencial estrategia terapéutica para tratar esta enfermedad neurodegenerativa.
4. La escasa microglía activada que se detecta en los pacientes se encuentra asociada a las placas y presenta un perfil Iba1+/CD45+/CD68+/P2ry12- a diferencia de la microglía no activada interplaca que es Iba1+/CD45-/CD68-/P2ry12+. Esta microglía activada muestra un fenotipo no inflamatorio y la presencia de $A\beta$ intracelular indica un posible papel en la dinámica de formación/compactación y/o eliminación de las placas fibrilares. Según nuestros datos y en contraposición a otros estudios, esta microglía no tiene origen periférico. En conjunto, nuestros datos ponen de manifiesto las notables diferencias en la respuesta microglial de los pacientes frente a los modelos animales, por lo que sería necesario desarrollar nuevos modelos, o mejorar los ya existentes, atenuando la respuesta inmune innata para así reproducir más fielmente lo que ocurre en los pacientes.
5. En los pacientes, y en contraste con la reducida respuesta microglial, existe una patente hiperactivación de los astrocitos siendo además estas células gliales muy resistentes al proceso degenerativo. El posible papel patológico/protector de los astrocitos reactivos en los pacientes de Alzheimer no ha sido aún establecido, aunque nuestros datos indican que esta hiperactivación produciría un aumento de toxicidad ya que parecen adoptar un fenotipo proinflamatorio neurotóxico con producción de $TNF\alpha$.
6. Las interneuronas que expresan SOM, implicadas en procesos de memoria, presentan una elevada vulnerabilidad en el hipocampo y giro parahipocampal de pacientes en fases avanzadas y en modelos APP/PS1 desde edades tempranas. Sin embargo, la población que expresa PV es altamente resistente en los modelos animales mientras que en los pacientes

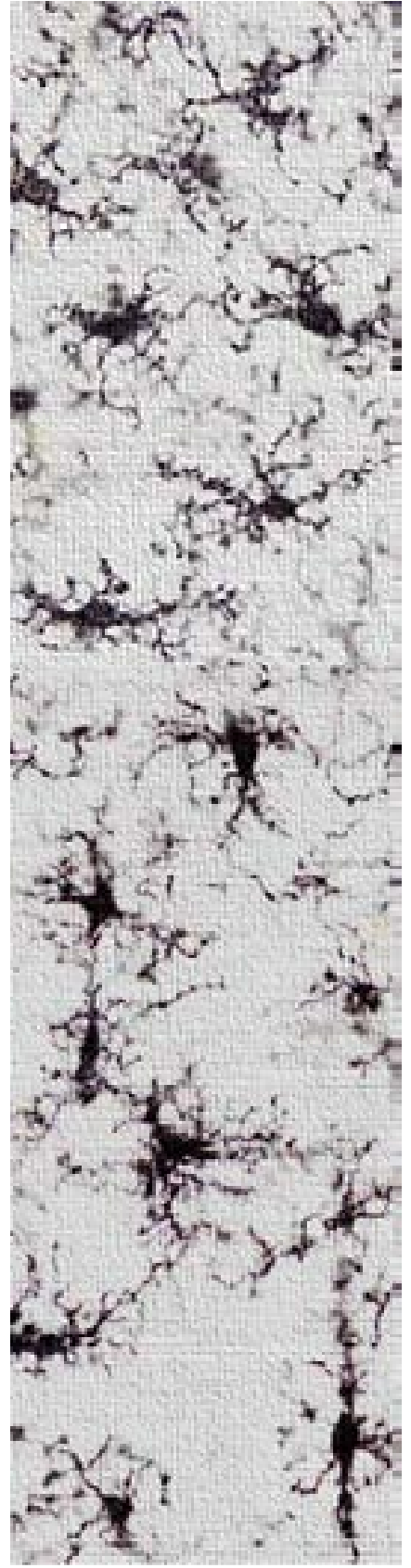
sufre un marcado proceso degenerativo que se podría explicar por la acumulación de formas solubles de fosfo-tau y/o por la disfunción de la homeostasis glial.

7. La exposición de ratones APP/PS1 al humo del tabaco, un factor ambiental de alto impacto en la sociedad humana, produce un incremento significativo de las lesiones neuropatológicas asociadas a la enfermedad de Alzheimer en este modelo animal como son la carga amiloide, la fosforilación de tau y el proceso neuroinflamatorio. Estos resultados indican que el tabaco podría acelerar la progresión de esta patología entre los fumadores activos/pasivos, siendo por tanto un potencial factor de riesgo ambiental para el Alzheimer.

1. The phospho-tau pathology is much more prominent than the amyloid pathology in the hippocampus and parahippocampal gyrus of Alzheimer's patients. The neurofibrillary degenerative changes follow the topographic pattern of Braak stages affecting the hippocampus in the initial stages. However, A β pathology shows a highly variable regional pattern and reaches the hippocampus only in the most advanced stages. The high level of phospho-tau in contrast to the low content of A β in the soluble fraction suggests that the soluble phospho-tau forms might trigger the neurodegenerative process in patients.
2. The amyloid pathology in patients exhibited a marked regional variability, with formation of fibrillar and neuritic plaques in the dentate gyrus, classic plaques in CA1 and parahippocampal gyrus cortex and diffuse plaques only in the last region, suggesting different origins or progression patterns of these deposits. These results differ from those in APP/PS1 transgenic models where all plaques are neuritic, revealing the poor reproducibility in these animal models of amyloidosis process that occurs in patients. Characterization of the disease progression in patient samples is the key to improve and validate the existing animal models for preclinical testing..
3. In AD patients there is limited microglial activation associated with amyloid plaques, and even most relevant, a patent microglial degenerative process in advanced disease stages. This microglial response is in stark contrast to that observed in transgenic APP/PS1 models which microglia is activated and proliferates gradually with disease progression. Therefore, the classical concept of cytotoxic microglial response associated to this disease should be reevaluated, a fact that is reinforced by the failure of therapeutic anti-inflammatory strategies tested to date in patients. Therefore preventing microglial dysfunction/death could be a novel and potential therapeutic strategy for this neurodegenerative disease.
4. The low activated microglia detected in patients is associated with the plaques and shows Iba1+/CD45+/CD68+/P2ry12- profile while non activated interplaque microglia is Iba1+/CD45-/CD68-/P2ry12+. This activated microglia shows a non-inflammatory phenotype and the presence of intracellular A β indicates a possible role in the dynamics of formation/compaction and/or removal of fibrillar plaques. According to our data and in contrast to other studies, this microglia has not a peripheral origin. Together our data show significant differences in microglial response between patients and animal models, so it would be necessary to develop new models, or improve the existing ones, diminishing the innate immune response in order to better mimic the response of patients.
5. In patients with dementia (Braak V-VI), and opposed to the attenuated microglial response, there is a patent hyperactivation of astrocytes which are also highly resistant to the degenerative process. The potential pathological/protective phenotype of reactive astrocytes in Alzheimer's patients has not yet been established, though our data indicate that this hyperactivation results in increased toxicity because they seem to adopt a neurotoxic proinflammatory phenotype with TNF α production.
6. Interneurons expressing SOM, involved in memory processes, show a high vulnerability in the hippocampus and parahippocampal gyrus of patients in advanced disease stages and also in APP/PS1 models since early ages. However, the population expressing PV is highly resistant in animal models while in patients suffer a marked degenerative process that could be explained by the accumulation of soluble forms of phospho-tau and/or by the glial homeostasis dysfunction.

7. Exposure of APP/PS1 mice to cigarette smoke, an environmental high impact factor in human society, produces a significant increase of the neuropathological lesions associated with Alzheimer's disease in this animal model such as the amyloid load, tau phosphorylation and neuroinflammatory process. These results indicate that cigarette smoke could accelerate the progression of this disease among active passive smokers, being so a potential environmental risk factor for Alzheimer's disease.

6. *Summary*



PhD Thesis - 2015

Thesis Title: *“Neuropathological study of hippocampus and parahippocampal gyrus in Alzheimer’s disease: from transgenic models to humans”*

Author (PhD Student)

ELISABETH SÁNCHEZ MEJÍAS - 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 (Professor of Cell Biology at Malaga University, Spain) and Dr. Inés Moreno (Assistant Professor of Neurology at University of Texas Health Science Center at Houston, EEUU)

Contact Information

Elisabeth Sánchez Mejías

Email: elisanchez@uma.es

Phone: 34-952131935

Address: Dept. Biología Celular. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga. Teatinos 29071. Málaga, Spain

Dr. Antonia Gutiérrez

Email: agutierrez@uma.es

Phone: 34-952133344

Address: Dept. Biología Celular. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga. Teatinos 29071. Málaga, Spain

Grants Support:

This work was supported by grants PI09/00099 (2010-2013) and PI12/01431 (2013-2015) from Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS/Carlos III Health Institute), by grant PI09-496 (2010-2012) from Junta de Andalucía and by CIBERNED (2007-2015) from Carlos III Health Institute, Spain. Elisabeth Sanchez Mejias was sponsored by a PhD fellowship from FPU program (Ministry of Education, Culture and Sports, MECD, Spain) and by a CIBERNED contract.

Publications in peer-reviewed journals:

1. Trujillo-Estrada L, Davila JC, Sanchez-Mejias E, Sánchez-Varo R, Gomez-Arboledas A, Vizuite M, Vitorica J, Gutiérrez A. Early neuronal loss and axonal/presynaptic damage is associated with accelerated amyloid- β accumulation in A β PP/PS1 Alzheimer's disease mice subiculum. **Journal of Alzheimer's Disease** (2014) 42(2):521-41.
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. 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.
3. Moreno-Gonzalez I, Estrada LD, Sanchez-Mejias E, Soto C. Smoking exacerbates amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. **Nature Communications** (2013) 4:1495.
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. 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.
5. 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, Garcia-Verdugo JM, Jimenez AJ, Vitorica J and Gutierrez A. *Autophagic vesicles accumulate in axonal dystrophies and disrupt presynaptic terminals in young Alzheimer's transgenic mice hippocampus.* **Acta Neuropathologica** (2012) 123(1):53-70.
6. 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. *Age-dependent accumulation of soluble Abeta oligomers reverses the neuroprotective effect of sAPPalpha by modulating PI3K/Akt-GSK-3beta pathway in Alzheimer mice model.* **Journal of Biological Chemistry** (2011) 286(21):18414-18425.
7. 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. *Calretinin interneurons are early targets of extracellular amyloid-beta pathology in PS1/AbetaPP Alzheimer mice hippocampus.* **Journal of Alzheimer's Disease** (2010) 21(1):119-132. * equal contribution.
8. Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Laura Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, del Rio JC, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuite M, Vitorica J, Gutierrez A. *Extracellular A β and cytotoxic glial activation induce significant entorhinal neuron loss in young PS1_{M146L}XAPP_{751SL} mice.* **Journal of Alzheimer's Disease** (2009) 18:755-776.

6.1. ABSTRACT

Accumulation of extracellular amyloid-beta ($A\beta$) deposits, intracellular formation of neurofibrillary tangles (NFTs) and progressive loss of neuronal cells are the major neuropathological lesions in Alzheimer's disease (AD) brains. Synaptic loss/dysfunction has been considered the best pathological correlate of early decline in cognitive function in AD. No effective therapies have been developed yet, while mechanism-based explorations of therapeutic approaches have been intensively investigated. The anticipated increase of AD patients in next few decades makes development of better therapy an urgent issue. Although the notion that neuroinflammation contributes to AD emerged in the early 90's, there is no successful treatment of AD based on inflammation. In fact, in the last decade there has been a spectacular failure of disease-modifying drugs in clinical trials of AD. The role of the neuroinflammatory cells in AD and the functional changes of microglia during disease progression are still unknown (revised in Heneka et al. 2014, 2015b, 2015a). Chronic inflammation with activated microglia could mediate neuronal damage and death by producing toxic products, leading to a cascade of harmful pathogenic events. However, the microglial phenotypes in the human pathology have not been determined yet. Inflammatory reactions in the brain might differ among astrocytes, microglia or infiltrated cells, anatomical location, disease and disease-stages, and not all inflammatory processes are detrimental. The recognition of this heterogeneity is essential to develop efficient drugs for AD therapeutics targeting very specific inflammatory targets.

To study AD-related pathology and the mechanisms underlying neurodegeneration, mice harbouring mutations of the familiar forms of AD are widely used. However, most of these transgenic mice fail to display neurodegeneration besides prominent $A\beta$ accumulation. The APP_{751SL}/PS1_{M146L} model develops $A\beta$ plaques since early ages (Blanchard et al. 2003; Caballero et al. 2007; Sanchez-Varo et al. 2012). We have previously reported the early and selective vulnerability of GABAergic interneurons subpopulations in the hippocampus (Ramos et al., 2006; Baglietto-Vargas et al. 2010), entorhinal cortex (Moreno-Gonzalez et al. 2009) and subiculum (Trujillo-Estrada et al. 2014) of this model, as occurs in humans. Although we found an early loss of principal cells in the entorhinal cortex (Moreno-Gonzalez et al. 2009) and subiculum (Trujillo-Estrada et al. 2014), no significant hippocampal principal cell degeneration was detected until 17-18 months of age (Ramos et al. 2006; Caballero et al. 2007; Schmitz et al. 2004). Most, if not all extracellular deposits have neuritic nature, and the swollen axons/presynaptic terminals exhibit accumulation of autophagic vesicles (Sanchez-Varo et al. 2012; Torres et al. 2012), as has been described in patients (Nixon et al. 2005; Nixon and Yang 2011). Most AD models exhibit scarce or delayed neuronal loss in despite of the accumulation of extracellular/intracellular $A\beta$. To address this question we have reported the dual role (neuroprotective/neurotoxic) of microglial activation during the time course of the $A\beta$ associated neuroinflammatory response in the hippocampus of PS1/APP mice (Jimenez et al. 2008). In this sense, at early ages the activated microglial cells displayed an alternative phenotype that could

explain the limited neuron loss, however at advanced ages activated microglia exhibited a classical cytotoxic phenotype that probably could be responsible of the principal cell death in this model. The switch from alternative to classical phenotype was associated to an increase in the soluble oligomeric A β content. In fact, in vitro studies demonstrated that A β oligomers from S1 fractions of old PS1/APP mice hippocampus induced microglial activation and TNF- α expression (Jimenez et al. 2008). Furthermore, increased A β -oligomer levels are able to counteract the prosurvival pathways (PI3K/Akt/GSK3 β) that are stimulated by soluble APP- α at early ages, leading to neurodegeneration (Jimenez et al. 2011).

In the present PhD thesis, we have now analysed, by cellular and molecular approaches, the main neuropathological hallmarks (amyloid plaques, neurofibrillary tangles/phospho-tau pathology, neuritic dystrophy, neuronal loss and gliosis) in hippocampus and parahippocampal gyrus of human AD brains, and compared them with the course of the pathology in the PS1_{M146L}/APP_{751SL} mouse model. Most relevant outcomes from this work are: 1) phosfo-tau pathology is much more prominent than A β pathology in human AD hippocampus; in addition, the progression of amyloid pathology shows great regional and inter-individual variability in patients with involvement of the hippocampus only in advanced stages of the disease. 2) there is a limited microglial activation along with a dysfunction/degeneration process of this population in patients at advanced stages of the disease while in animal models of AD microglia cells activate and proliferate gradually during disease progression. Therefore, the classical concept of cytotoxic microglial response associated with this disease in patients should be reevaluated, a fact that is reinforced by the failure of therapeutic anti-inflammatory strategies tested to date in patients. Therefore preventing microglial dysfunction/death could be a novel and potential therapeutic strategy for this neurodegenerative disease. Moreover, and opposed to the attenuated microglial response, there is a patent hyperactivation of astrocytes which are also highly resistant to the degenerative process; 3) we observed a substantial loss of somatostatin- and parvalbumin-positive GABAergic interneurons in these AD brain areas. In the same way, interneuron deficits have been previously documented in APP/PS1 models in the hippocampus and entorhinal cortex, and now here we extended to the perirhinal cortex; 4) smoke produced a significant increase of the neuropathological lesions associated with Alzheimer's disease in an APP/PS1 animal model such as the amyloid load, tau phosphorylation and neuroinflammatory process. These results indicate that cigarette smoke could accelerate the progression of this disease among active passive smokers, being a potential environmental risk factor for Alzheimer's.

Overall, these results show that models overexpressing APP and developing amyloid plaques do not mimic major aspects of the human pathology, especially the inflammatory response associated with microglial cells. Therefore, it would be necessary to develop new models, or improve the existing ones, diminishing the innate immune response in order to better mimic the response seen of patients. We propose that the microglial homeostasis dysfunction, along with astroglial hyperactivity, might be responsible for the neurodegeneration and dementia in Alzheimer's patients. This new approach might open new avenues for the design of therapeutic strategies directed to prevent or modulate glial dysfunction.

6.2. LITERATURE OUTLINE

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 (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 Ab, 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) 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 Castellani et al. 2010; Perl 2010; Serrano-Pozo et al. 2011; Reitz et al. 2011; Karch et al. 2014). The senile plaques are extracellular deposits of amyloid beta (Abeta) 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. 2004; Gomez-Isla et al. 1996) 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.

Studies of familial Alzheimer's disease (FAD) motivate the discovery of responsible genetic factors, establishing A β -centered theory for AD. Amyloid precursor protein (APP) experiences sequential cleavages by β -secretase and γ -secretase and gives rise to β -amyloid (A β) that is thought to initiate soluble oligomers, insoluble fibrils, and accumulated plaques. However, failures in many large clinical trials using A β -targeted drugs and approved compounds with marginal efficacy questioned the validity of A β cascade hypothesis. Indeed, A β hypothesis, having dominated the AD realm for two decades, has always been controversial (review by Karran et al. 2011; Morris et al. 2014; Herrup 2015).

Moreover, it has also been proposed the existence of a neuroinflammatory process that could play a key role in the development of the disease (Heneka et al. 2014, 2015a,b). Genetic studies, performed on thousands of patients (GWAS) have shown a clear association between AD and mutations in genes directly involved in the immune response. Among the candidate genes, other than APOE locus, these studies have identified TREM2, CD33 and HLA mutations (see Lambert et al. 2013). Both TREM2 as CD33 are implicated in the microglial activation and/or Abeta internalization (Bradshaw et al. 2013; Cruchaga et al. 2014; Griciuc et al. 2013; Hickman y El Khoury 2014) so its disruption could result in a decrease in the phagocytic capacity of this peptide.

However, the role of microglial activation in the development of pathology is not known (Streit et al. 2014). Classically, the microglial response has been associated with neurodegenerative process observed in AD. This association is based on the ability of microglial cells to activate in the presence of any damage or cerebral insult, and produce large amounts of cytotoxic proinflammatory cytokines. In fact, the microglial cells can rapidly activate and differentiate into various phenotypes: an alternative phenotype (M2), characterized by cytokine production with neuroprotective capacity induced by different mediators such as IL-4 and IL-13, and a classic phenotype (M1), characterized by the production of inflammatory cytokines (IL-1beta, TNF-alpha) and reactive oxygen species (reviewed in (Mosher y Wyss-Coray 2014; Li et al. 2014; Heneka et al. 2015a; Cai et al. 2015).

The cytotoxic vision of microglial activation is based on the findings in transgenic models disease (Heneka et al, 2014). Specifically, the characterization of microglial activation has been studied in A β transgenic models (APP or APP/PS1) since models based on overexpression tau have had very limited glial activation. In this respect, it has been described that microglial activation display a cytotoxic profile in these models (Heneka et al, 2014). It has also been suggested that microglia exerts no role in the maintenance and/or formation of A β plaques (Grathwohl et al. 2009), although these data are controversial.

Our research group has previously characterized this inflammatory response in the APP751SL/PS1M146L model (Jimenez et al. 2008; Moreno-Gonzalez et al. 2009; Torres et al. 2012). Our data have shown the existence of a clear microglial activation process in parallel with the progression of A β pathology. This activated microglia shows proinflammatory phenotype, especially at later ages (18 months), coinciding with the increase of forms oligomeric soluble A β in the

hippocampal parenchyma. These soluble forms of A β from AD models besides stimulating microglia could directly affect neurons increasing their vulnerability (Carriba et al. 2015). Based on these facts, it seems that the microglia exert a cytotoxic role to neurons in the pathology of AD.

In addition, activation of astrocytes is also characteristic of AD (Sidoryk-Wegrzynowicz et al. 2011; Verkhatsky et al. 2014). It manifested from the earliest stages of the disease (Carter et al. 2012) and progresses significantly as does the amyloid and tau pathology. However, the role of reactive astrocytes it is today largely unknown. The term "reactive" is insufficient to determine whether astrocytes contribute to the pathology of AD by toxic gain of function or loss, or, on the contrary are protective, or even have different functions depending on the state of the pathology and/or their regional location. Moreover, it has recently been suggested that astrocytes may play a role in the so-called "glymphatic system" (Nedergaard 2013) to generate interstitial fluid flows from perivascular space, from the arterial branches to the venous branches. This glymphatic flow could be responsible for drain excess of extracellular toxic proteins, such as Abeta preventing its accumulation. Activation of astrocytes in the pathology of AD could alter or disrupt this flow and therefore results in increased toxicity

Taking into account that the implication of the glial response (microglia and astroglia) in the pathology of Alzheimer's disease is not known and most information, both at the molecular and cellular level has been obtained from transgenic disease models we will study in this doctoral thesis the neuroinflammatory response in postmortem hippocampus and parahippocampal gyrus samples from AD patients and compare the results with those in AD mice.

In the last decade, multiple lines of transgenic mice over-expressing one or more of the familial AD linked genes have been created (review by Ashe y Zahs 2010; Bilkei-Gorzo 2014; Webster et al. 2014). Although none of the mouse models recapitulates all aspects of AD, several lines develop robust AD-like pathology, including Abeta plaques surrounded by phospho-tau containing dystrophic neurites and activated microglial cells, synaptic damage, and age-related learning and memory deficits. These AD 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 A β content, neuronal dysfunction and memory impairment. However, most models, despite extensive amyloid deposition in some lines, do not have widespread neuronal loss as seen in AD brains. However, we have previously reported using unbiased, stereological neuronal counting a selective neuronal loss (SOM/NPY and CR interneurons) in the hippocampus, entorhinal cortex and subiculum of a APP/PS1 model at early ages (Ramos et al. 2006; Moreno-Gonzalez et al. 2009; Baglietto-Vargas et al. 2010; Trujillo-Estrada et al. 2014). Pyramidal degeneration occurs early in subiculum and enthorinal cortex (Trujillo-Estrada et al. 2014; Moreno-Gonzalez et al. 2009), whereas in the hippocampus takes place at later stages (18 months; Schmitz et al. 2004; Jimenez et al. 2008). Another important objective of this Thesis will be to validate this neuronal loss in the human samples from AD patients.

6.3. AIMS OF THE STUDY

The fact that many potential therapeutic targets that have been defined mainly around the pathogenetic hypothesis of the "amyloid cascade" have not been translated into effective treatments highlights the need to better understand the disease mechanisms and develop better animal models that mimic the pathology seen of patients. One of the pathogenetic mechanisms that has gained recognition in recent years is that played by glial cells (especially microglia) in Alzheimer's disease. To date, the therapeutic strategies designed to modulate the inflammatory response have been unsuccessful in patients. One possible explanation for this translational failure of preclinical data from human clinical models may be due to the existence of differences in the innate immune response between animal models and patients.

Therefore, a major biomedical issue in the treatment and care of AD patients is the need of better animal models and biomarkers to study AD progression, identify new therapeutic targets and develop new pharmacological approaches against this devastating illness.

Most of the information at the molecular and/or cellular level on the evolution of the pathology of AD has been obtained mainly in transgenic models of the disease. Therefore, the **main objective** of this doctoral thesis is to conduct a histopathological study of hippocampal and parahippocampal gyrus of postmortem samples from patients at various stages of the disease (Braak II to VI). This study will advance the knowledge of the mechanisms involved in the development of the pathology and, second, compare the data with those obtained in transgenic models in order to assist in the selection and/or improvement of models of pathology. In addition, it is proposed to continue the study and characterization of transgenic models from a translational perspective to identify possible targets of therapeutic interest which may be used in the development of new strategic protection

1. **The first specific objective of this work is to make a preliminary histopathological characterization of neurofibrillary pathology progression, due to hyperphosphorylation of tau (NFTs or neurofibrillary tangles, neuropil filaments or NTs, and dystrophic neurites) and amyloid pathology in the postmortem human hippocampus and parahippocampal gyrus from mild (Braak II), moderate (Braak III-IV) and severe (Braak V-VI) tau pathology stage.**

For this aim, immunohistochemical detection of hiperphosphorilated tau and amyloid beta with different antibodies will be performed. Here we examined the spatial distribution pattern of different plaques (fibrillar, dense-core with non-fibrillar halo, and diffuse). The nature, morphology and content of the dystrophic neurites found in the hippocampus will be also studied. Moreover, in order to study the plaques morphology in depth, we will apply confocal double/triple fluorescence and image analysis quantification. Additionally, samples of mice APP/PS1 4, 6 and 12 months of age

will be used in order to compare the results obtained in samples from Alzheimer's patient data in the animal model.

2. The **second specific objective** of this work is to study the Inflammatory response in the hippocampus and parahippocampal gyrus of patients during the progression of the pathology from Braak II to Braak V-VI stages. For this, we will determine 1) the regional pattern of microglial phenotypic progression (quiescent, activated or senescent) in relation to senile plaques; and 2) the astroglial response accompanying amyloid and neurofibrillary pathology. For this purpose, immunohistochemical techniques for specific markers of glial phenotype for both populations, confocal laser microscopy and morphometric and stereological analysis will be used. In addition, the expression of some microglial and astroglial markers will be assessed by Rt-PCR. Samples of mice APP/PS1 of 4, 6 and 12 months of age will be used in order to compare the results obtained in Alzheimer's patients with the data observed in this animal

3. The **third specific objective** of this work is to study the vulnerability of different neuronal populations of the hippocampus and parahippocampal gyrus of patients Braak II, III- IV and V -VI. The main GABAergic interneurons (SOM and PV) will be analyzed in the dentate gyrus, CA1 and perirhinal cortex. The research group has previously characterized these neuronal populations in the hippocampus and entorhinal cortex of the transgenic model APP/PS1. However, the perirhinal cortex has not undergone previous study therefore in this objective we will include the analysis of this brain region in order to compare the results with those obtained in patients and thus validate the predictive value of this animal model. In order to assess the neurodegeneration, immunohistochemistry for light microscopy, confocal double fluorescence and stereology-based quantifications will be performed. In addition, the expression of SOM, NPY and PV mRNAs will be assessed by Rt-PCR.

4. The **four specific objective** is to analyse the effect of smoke inhalation, a high impact environmental factor in human society, on major neuropathological alterations in a APP/PS1 transgenic model. For this, amyloid load, inflammatory response, tau phosphorylation and neurodegeneration in the hippocampus and cortex of mice exposed to different doses of smoke will be determined. Histological, immunological techniques, quantitative stereological and morphometric analysis will be used. This objective was carried out in collaboration with the laboratory of Dr. Soto and Dr. Moreno- Gonzalez (USA) and will be presented in the form of scientific publication.

6.4. MATERIALS AND METHODS

Human brain samples

Human brain tissue was obtained from the Institute of Neuropathology Brain Bank IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge (Barcelona, Spain) and from the Brain Bank of BT-CIEN-Fundación CIEN (Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain) at autopsy of non-demented controls (n=3) and clinically diagnosed mild (Braak II; n=7), moderate (Braak III-IV; n=7) and severe (Braak V-VI; n=10) AD cases, with a post mortem delay between 3 and 16 h. The brain samples were obtained with the approval of local ethics committee, following Spanish and European Union legislation.

Samples of the hippocampal cortex were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB) for 24-48h, cryoprotected in sucrose, stored at -80 °C, sectioned (30 µm thickness) on a freezing microtome and serially collected in wells containing 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) and 0.02% sodium azide. Following a neuropathological examination, AD stage was defined according to Braak and Braak (Braak and Braak, 1991).

Transgenic mouse samples

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) mice (Charles River, France). Mice represented F6–F10 offspring of heterozygous tg mice. 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 University.

After deep anaesthesia with sodium pentobarbital (Dolethal[®], 60 mg/kg), 4-to-12-month-old control (WT) and PS1/APP tg mice were perfused transcardially with 0.1M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, followed by 4% paraformaldehyde, 75mM lysine, 10mM sodium metaperiodate in 0.1M 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 (each one containing one control and one PS1/APP tg mice).

Anatomical boundaries

The hippocampal formation involves the subiculum, the hippocampus proper and the dentate gyrus. The subiculum continues laterally with the parahippocampal cortex. Henceforth, we will refer to the hippocampus proper and the dentate gyrus as hippocampus. Mouse hippocampus can be found from Bregma -0.94 mm to Bregma -4.04 mm in the histology atlas (Franklin and Paxinos, 2007). At rostral levels, the hippocampus appears dorsally, after septum, inferior to the corpus callosum, superior to the dorsal thalamus and dorso-laterally bordered by the parietal cortex. Caudo-ventrally, it is situated close to the amygdaloid complex and its lateral boundaries are defined by the entorhinal and perirhinal cortex, among others.

For human brain delimitations, we followed the Atlas of the Human Brain (Mai et al. 2008) and Allen Brain Atlas (www.brain-map.org). Human hippocampal formation can be found with the stereotaxic coordinates 6.7 mm and 44.9 mm. Parahippocampal region involves presubiculum, parasubiculum, entorhinal cortex, perirhinal cortex and parahippocampal cortex, and it is situated between -10 mm and -50.3 mm coordinates.

Perirhinal cortex belongs to the parahippocampal region, within the temporal medial lobe. Mouse perirhinal cortex can be found from Bregma -1.34 mm to Bregma -4.60 mm in the Franklin and Paxinos Atlas (2007). Areas 36 and 36 can be delimited thanks to differential neuropile immunostaining using anti-Calretinin or anti-Parvalbumin antibodies. Moreover, 6E10 antibody allows to make a distinction among layers, since layers II-III within the area 35 and, the layer V in the area 36, are strongly immunoreactive to it.

Immunohistochemistry

Sections that represented 1/7th of the total hippocampus from control and PS1/APP mice, and the AD brain sections, were processed in parallel for light microscopy immunostaining using the same batches of solutions to minimize variability in immunohistochemical labelling conditions.

Free-floating sections were first treated with 3% H₂O₂ and 10% methanol in PBS 0.1M pH 7.4 for 15 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 immunoreacted with one of the primary antibodies: anti-APP (1/20000 dilution; Sigma-Aldrich) rabbit polyclonal, anti-A β 4G8 (1:2000 dilution; Covance) mouse monoclonal, anti-A β OC (1:5000 dilution; Merck-Millipore) rabbit polyclonal, anti-A β 42 rabbit polyclonal (1:1000 dilution; Merck-Millipore), anti-AT8 mouse monoclonal (1:500 dilution, Pierce Biotech.), anti-AT100 mouse monoclonal (1:500 dilution, Pierce Biotech.), anti-ALDH1L1 monoclonal antibody (1:2000 dilution, Merck-Millipore), anti-CD45 rabbit polyclonal (1:1000 dilution; Abcam), anti-CD68 monoclonal antibody (1:1000 dilution, Dako), anti-CX3CR1 (1:500 dilution, Abcam) polyclonal antibody, anti-ferritin (1:500 dilution, Sigma-Aldrich) polyclonal antibody, anti-GFAP (1:2000 dilution, Chemicon) polyclonal antibody, anti-GFAP (1:10000 dilution, Dako) polyclonal antibody, anti-Iba1 (1:1000 dilution, Wako Chemicals) polyclonal antibody, anti-Iba1 (1:2000 dilution,

Abcam) polyclonal antibody, anti-NeuN (1:1000 dilution, Merck-Millipore) monoclonal antibody, anti-PV (1:5000, Swant) polyclonal antibody, anti-Somatostatin (SOM, D-20) goat polyclonal (1:1000 dilution; Santa Cruz Biotechnology), anti-TNF alpha (1:500 dilution; Santa Cruz Biotech) polyclonal antibody, over 24 or 48 hours 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), 0.03% nickel ammonium sulphate and 0.01% hydrogen peroxide in PBS. For double/triple immunolabelling, sections were first incubated with the primary antibody, then the peroxidase reaction was visualized as already described with DAB-Nickel (blue staining). Then, sections were washed and incubated in the second primary antibody. The next day, sections were processed for visualizing the reaction only with DAB (brown staining). For the third antibody, VECTOR VIP Peroxidase Substrate Kit (SK-4600, Vector Labs.) was used giving rise to a purple staining. Sections were 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 OC/Thioflavin-S fluorescence labelling, sections were first incubated with the primary antibody followed by Alexa568 conjugated secondary antibody. Then, sections were washed and processed for Thioflavin-S staining (see below).

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).

Human sections were embedded in autofluorescence eliminator reagent (Merck Millipore), following the manufacturer's recommendations, to eliminate fluorescence emitted by intracellular lipofuscin accumulation. Finally, all sections were mounted onto gelatine-coated slides, coverslipped with 0.01M PBS containing 50% glycerin and 3% triethylenediamine and examined under a confocal laser microscope (Leica SP5 II) or Olympus BX-61 epifluorescent microscope.

Thioflavin S and Congo red stainings

Free-floating sections were incubated for 5 minutes with 0.015% Thioflavin-S (Sigma) in 50% ethanol for mouse brains, and with 0.1% Thioflavin-S in 70% ethanol for human brains. Then, they were washed in 50% ethanol, mounted onto gelatine-coated slides and coverslipped with 0.01M 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 gelatine-coated slides, air-dried, dehydrated in graded ethanol, cleared in xylene and coverslipped with DPX (BDH) mounting medium.

Stereological analysis

Density of neurons SOM- and PV-positives were obtained by stereology-based quantification according to the optical fractionator method as previously described (Moreno-Gonzalez et al., 2009). Briefly, an Olympus BX61 microscope and the NewCAST software package (Olympus, Glostrup, Denmark) were used. In order to obtain the neuron density in mouse perirhinal cortex, the number of cells was quantified in 6 sections through the antero-posterior axis, separated by 280 μm along the Z axis. In AD samples, we employed 6 sections between the stereotaxic coordinates 17 mm and 35 mm, with 180 μm of separation between them. Subfields were defined using a 10x objective and the number of cells was counted using a 20X objective. The number of counting frames varied with the region or subfield layer analyzed.

The numerical density (ND; cells/ mm^3) of immunopositive cells was estimated using the following formula: $\text{ND} = \sum Q^- / (\sum a)$, where “Q-” is the number of dissector-counted somatic profiles, “a” is the area of the counting frame. The precision of the individual estimations is expressed by the coefficient of error (CE) (Gundersen et al. 1999) using the following formula: $\text{CE} = 1/Q_x(3A - 4B + C/12)^{1/2}$, 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 0.1 and 0.07. An investigator who was blind to the experimental conditions (age, genotype and marker) performed neuronal profile counting.

Plaque and glial loading quantification

Plaque loading was defined as percentage of total area stained for A β with OC, while glial loading was the percentage of area stained with either anti-Iba1 or anti-P2ry12a antibodies for microglia, and with GFAP for astroglia, respectively. Quantifications were performed in a similar way to the previously reported by Trujillo-Estrada et al. (2014). The stainings were examined under a Nikon Eclipse 80i microscope using a 4x objective. Images were acquired with a Nikon DS-5M digital camera using the ACT-2U software (Imaging Software, Nikon Corporation 2004). The camera settings were adjusted at the start of the experiment and maintained for uniformity. Digital images from Braak II, Braak III-IV and Braak V-VI ($n = 4-5/\text{age}$) were analyzed using Visilog 6.3 analysis program (Noesis, France). The plaque (OC positive) or glial (Iba-1 or P2ry12 positive) within the hippocampus or parahippocampal gyrus were identified by level threshold which was maintained throughout the experiment for uniformity. The color images were converted to binary images. The PHC area in each 4x image was manually outlined. The plaque/glial loading (%) for each individual 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 loadings were determined using all the available data. Quantitative comparisons were carried out on sections processed at the same time with same batches of solutions.

Coronal sections stained with the corresponding antibodies from human brains were analysed. Each analysis was done by a single examiner blinded to sample identities.

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm S.D. The comparison between two groups was done by two-tailed t-test or Mann-Whitney; and for comparing several groups, we used one-way ANOVA or Kruskal-Wallis ANOVA on ranks, followed by Tukey or Bonferroni post-hoc multiple comparison test (SigmaStat32® 3.5, *Advisory Statistics for Scientists* or GraphPad Prism 5, *GraphPad Software Inc.*). For both test, the significance was set at 95% of confidence.

The cellular studies were complemented with biochemical and *in vitro* studies that were done in collaboration with the laboratory of Dr. Vitorica (University of Seville). These methods are well described in Jimenez et al. (2008, 2011) and Torres et al. (2012).

6.5. RESULTS AND DISCUSSION

The major limitation of this study was the lack of information on the medical history of each patient. The only information available from the Biobanks was the Braak stage, the post mortem time and the existence or not of dementia, so that the samples used were classified as Braak II, III and IV cataloged as non-demented, while those classified as Braak V and VI showed dementia. The existence of other co-pathologies in both patients and controls used, such as diabetes, high cholesterol, stroke, etc., or even pharmacological treatments could be responsible for the heterogeneity data. Moreover, knowing the patient's genotype could have also been important because of the large number of genes associated to this disease, particularly APOE, the major risk factor in the onset sporadic Alzheimer's. We believe it would have been essential to know the data of disease progression (age at diagnosis, years of evolution of the disease, etc.), data from the mental status examination (MMSE, Mini-Mental State Examination; GDS, Global Deterioration Scale), the clinical dementia scale (CDR; Clinical Dementia Rating). Having all this information would have allowed us to interpret, group, or more accurately assess, the results obtained, particularly in those cases where the data are very heterogeneous within the same group, and would have allowed, after evaluating and correlate multiple parameters, better classification of patient groups. Therefore, it has not been possible to establish any correlation between the observed pathology and the duration of disease and cognitive deficits.

☑ CHAPTER 1

PROGRESIÓN OF NEUROFIBRILLARY PATHOLOGY IN POST-MORTEM HUMAN HIPPOCAMPUS AND PARAHIPPOCAMPAL GYRUS SAMPLES

Human AD samples were already classified by the Biobanks according to Braak-stages (Braak and Braak, 1991), however AT8 and AT100 staining were performed in our study in order to confirm this classification, and make a detailed qualitative analysis of the fosfo-tau pathology in each region of the different human samples. Our data show that the hippocampus and parahippocampal gyrus show a regional and temporal pattern of neurofibrillary lesions associated with phospho-tau as expected by the different stages of Braak (from II to VI). Tau pathology, analyzed by AT8 immunohistochemistry started in the CA1/CA2 regions, perirhinal and entorhinal cortex and the parahippocampal gyrus (Braak II); it spreads throughout the hippocampal formation affecting the subiculum and dentate gyrus, and layers III and V around the parahippocampal gyrus in moderate stages (Braak III-IV); and finally through all layers of hippocampus and parahippocampal gyrus showing phospho-tau accumulation in both cell bodies and dendritic and axonal processes (Braak V-VI).

The phosphorylated forms of tau monomers quantified by Western blot, in both total protein fraction and soluble fraction S1 from hippocampus, accumulate preferentially in demented Braak V-VI individuals. Tau accumulation may be due to changes in expression or failure in the protein degradation systems as proteasome (David et al. 2002; Zhang et al. 2005) autophagolysosomal pathway (Hamano et al. 2008; Wang et al. 2009). Furthermore, Simón and García-García (2012) suggest excretion into the extracellular medium of tau in vesicles. This fact along with the release of tau to the extracellular space after neuronal death, might explain the increase soluble tau monomers observed. In AD patients, as the disease progresses, monomeric tau is hyperphosphorylated and aggregated into neurofibrillary tangles. Currently, the toxic effect of these tau aggregates on containing neurons is unknown. In fact it has been described the existence of neurons that, in spite of showing high neurofibrillary tangles, do not lose the ability to establish synaptic connections (Kuchibhotla et al. 2014). Evidences suggest that the toxicity of tau does not require the formation of neurofibrillary tangles, but phosphorylated prefibrillar or oligomeric soluble forms, formed in a pre-assembly stage of NFTs may be toxic forms. Tau release into the extracellular space, caused by a process of neuronal death or activity, produce an increase of tau in the interstitial compartment and this could be internalized by endocytosis by other neurons producing a prion type propagation of tau pathology. In this regard, the decreased levels of soluble tau by gene suppression in an animal model prevented synaptic loss and pathology transynaptic propagation (Polydoro et al. 2013). Moreover, the beneficial effect of eliminating extracellular tau forms by immunotherapy has been describe in animal models (Boutajangout et al. 2011; Chai et al. 2011; d'Abramo et al. 2013; Yanamandra et al. 2013).

Data suggest that extracellular soluble fosfo-tau accumulation might be the most pathologically significant feature in AD patients.

☑ CHAPTER 2

PROGRESSION AND SPATIAL DISTRIBUTION OF AMYLOID PATHOLOGY IN POST-MORTEM HUMAN HIPPOCAMPUS AND PARAHIPPOCAMPAL GYRUS SAMPLES

Alzheimer's disease is characterized by typical neuropathological changes including extracellular A β deposition. According to the amyloid cascade hypothesis, accumulation and deposition of A β in the brain are the major events in the pathology of AD. Human samples were not previously classified by the biobanks of origin for amyloid pathology, therefore the characterization of the amyloid pathology in these samples has been an objective of the thesis to determine the degree of regional involvement in each case and correlate data with other pathological changes.

Notably, the amyloid pathology in our human samples is less prominent than the tau pathology. The hippocampus is the last region to be affected by A β plaques during disease progression. The accumulation of extracellular A β exhibits a great regional and inter-individual variability in human samples along Braak stages, whereas in the APP/PS1 model the amyloid pathology follows a specific spatiotemporal pattern. Besides this variability we could identify a topographic spatio-temporal pattern of progression of amyloid pathology in our human samples as follows: perirhinal cortex, presubiculum, entorhinal cortex, subiculum, CA1, molecular layer and polymorphic layer of dentate gyrus. The human parahippocampal gyrus is already severely affected by amyloid pathology samples in initial stages of tau pathology (Braak II), while the accumulation of A β in the hippocampus occurs in later stages according to a defined pattern. Early amyloid deposits were observed in Braak III-IV cases in the CA1, subiculum and the molecular layer of the dentate gyrus, while the hilum is affected only in the samples of demented individuals (Braak V-VI). The type of amyloid plaque that patients develop follows a specific pattern region: neuritic fibrillar deposits were observed in the dentate gyrus, classical plaques in CA1 and the parahippocampal gyrus, while only diffuse deposits were detected in cortex. Amyloid plaques in the hilar region of dentate gyrus appear only in demented patients Braak V-VI and were characterized as large fibrillar star-shaped with numerous dystrophic neurites that correspond to axons arriving from entorhinal cortex layer II (Hyman et al. 1984). Synaptic A β release could explain the particular distribution of the plaques found in Alzheimer patients. In fact, the accumulation of A β in the brain is directly related to synaptic activity and presence of oligomeric A β in pre- and post-synaptic compartments in post-mortem AD brain has been described (reviewed in Spire-Jones and Hyman 2014). In addition, the development of fibrillar plaques and the formation of dystrophies is a pathological phenotype that allows discriminate demented from non-demented individuals with high amyloid burden (Perez-Nievas et al. 2013).

The hippocampus of transgenic APP/PS1 shows a much more severe amyloid pathology than human AD samples, accumulating a large amount of monomers and oligomers of A β with age. Moreover, unlike in patients, the first plaques are formed in the hippocampal formation at very

young ages. Furthermore, the amyloid plaques of these transgenic mice are always fibrillar and neuritic regardless of the region analyzed.

Our data in patients and AD mice suggest that amyloid plaques are not inert structures but rather dynamic, and during disease progression plaques may change their properties in composition, size and possibly toxicity. We speculate that the levels of soluble A β oligomers depend on the ability of the plaques to release these toxic forms. In support of this idea, it has been experimentally demonstrated that natural lipids destabilize and rapidly resolubilize mature A β amyloid fibers as well as the detrimental effect of these soluble forms on cognition in mice (Martins et al. 2008).

Taken together the results of A β and tau indicate that in the hippocampus tau pathology is much prominent than A β pathology, although the disease has been mainly associated with the presence of A β plaques. In animal and cell models have been shown that tau may be necessary for the synaptotoxic effect of oligomeric A β (reviewed in Crimins et al. 2013). This leads us to think that the pathology of AD depends more on the state of phosphorylation of tau than in A β accumulation. However, we cannot rule out oligomeric soluble A β as major toxic agent and speculate that amyloid plaques might be potentially major sources of these soluble toxic A β -aggregates. Moreover, a link of both soluble protein species (A β and phospho-tau) is postulated as responsible for the synaptotoxicity in AD (reviewed in Spires-Jones and Hyman, 2014).

☑ CHAPTER 3

CHARACTERIZATION OF THE INFLAMMATORY RESPONSE IN THE POSTMORTEM HUMAN HIPPOCAMPUS AND PARAHIPPOCAMPAL GYRUS SAMPLES ALONG DISEASE PROGRESSION

The function of glia (microglia and astroglia) in Alzheimer's disease (AD) is not known. The actual view gives a neurotoxic role to the microglial activation and a neuroprotective role to astrocytes. This view is based primarily on studies in transgenic models of AD. These models show a marked microglial response with a neurotoxic profile. Here we studied the microglial and astroglial response in postmortem human AD samples and transgenic mice. Immunostainings for light and confocal microscopy, were performed in hippocampal and parahippocampal gyrus samples from human autopsies and APP_{751S}/PS1_{M146L} mice.

In the hippocampus and parahippocampal gyrus of AD patients there is a limited microglial activation associated with the plaques during the progression of the disease, and what is more relevant, there is a significant degenerative processes of these microglia in demented patients (Braak V-VI). By contrast, in transgenic APP/PS1 mice there is a exacerbated microglial activation that gradually increases with the progression of amyloid pathology. The microglial cells surrounding the amyloid plaques in human samples exhibited typical morphological changes of a moderate activation process and was characterized by Iba1+/CD68+/CD45+/P2ry12- phenotype whereas the quiescent interplaque microglial cells exhibited Iba1+/CD68-/CD45-/P2ry12- profile.

In AD patients, microglia closely surrounding, or infiltrating, neuritic plaques presents intracellular A β suggesting a possible phagocytic and/or plaque compaction/fibrillation role. In contrast to animal models, low infiltration of macrophages and lymphocytes in patients with Alzheimer was detected. The partially activated microglial cells surrounding plaques, do not present a peripheral origin. In contrast to Alzheimer's patients, the microglial response in transgenic APP/PS1 mice is characterized by an extensive activation changes from early ages, both around the extracellular deposits and in interplaque regions, and increases gradually with age, showing a TNF α -positive M1 proinflammatory phenotype. Also, a high infiltration of T cells in hippocampus and cortex, compared to patients Braak V–VI, was determined.

We found that the microglia of Braak V-VI patients with dementia suffers a serious degenerative process characterized by a significant decrease in the area occupied, as well as the observation of pathological morphological features (atrophy and fragmentation) in this population. This senescent/degenerative phenotype is exhibited by both the general population of microglia Iba1-positive (in the dentate gyrus and in the CA3 region) and the quiescent microglial cells that are P2ry12-positive located in the interplaque regions (in all brain regions analyzed).

In vitro studies along with flow cytometry approaches revealed that the phosphorylated forms of tau from soluble S1 fractions of Alzheimer's hippocampus, and not from the APP/PS1 mice, were toxic for microglial cells but not for astrocytes.

On contrary to the attenuated microglial response, the astroglial population of hippocampal and parahippocampal gyrus of the human samples Braak V-VI exhibits a strong reactivity associated with A β plaques, similar to that observed in APP/PS1 mice, and unlike expected, a proinflammatory phenotype producing TNF α .

Together these data revealed significant differences in microglial response between patients and animal models, so it would be necessary to develop new models, or improve the existing ones, diminishing the innate immune response in order to better mimic the response of patients. Therefore, the classical concept of cytotoxic microglial response associated with this disease in patients should be reevaluated, a fact that is reinforced by the failure of therapeutic anti-inflammatory strategies tested to date in patients. Therefore preventing microglial dysfunction/death could be a novel and potential therapeutic strategy for this neurodegenerative disease.

☑ CHAPTER 4

NEURODEGENERATIVE PROCESS OF SOM AND PV INTERNEURONS IN THE HIPPOCAMPUS AND PARAHIPPOCAMPAL GYRUS OF ALZHEIMER'S PATIENTS AND APP/PS1 MICE

Neuron loss is the best anatomopathological substrate that correlates with cortical atrophy and dementia during disease progression in AD. According to the amyloid cascade hypothesis, specific neuronal networks are preferentially affected by A β pathology during disease progression. Among these, the distinct subpopulations of hippocampal inhibitory GABAergic interneurons have been shown to be highly vulnerable. In this sense, we have previously reported a substantial loss of somatostatin (SOM) containing interneurons in the hippocampus of APP-based transgenic mouse models, with a linear correlation with the A β content and glial activation. Specifically, at early ages, the GABAergic system is severely affected in the hippocampus of the PS1/APP model. Significant loss of CR (Baglietto-Vargas et al. 2010) and dendritic inhibitory SOM/NPY (OL-M and HIPP cells) (Ramos et al. 2006) interneurons was found at 4 and 6 months of age respectively, whereas the neuronal density of perisomatic inhibitory PV-positive subpopulation did not change. In addition, SOM/NPY neurons are also early affected in the entorhinal cortex (Moreno-Gonzalez et al., 2009) and subiculum (Trujillo-Estrada et al. 2014) of this model. Here now we studied the differential vulnerability of GABAergic neurons in the hippocampus and perirhinal cortex of post-mortem human AD brains. In addition, we will analyze the perirhinal cortex of this AD model to compare the results with those obtained in patients and thus validate the predictive value of this animal model.

The population of SOM-positive interneurons of Braak V -VI shows a significant decrease in the dentate gyrus and the perirhinal cortex, along with a general reduction in SOM axonal plexus in all regions studied. Moreover, in Alzheimer's patients, unlike animal AD models, there is a significant reduction in the neuronal density (cells/mm³) of the population expressing PV with a reduction of PV-positive nerve fibers.

On the other hand, in the perirhinal cortex of APP/PS1 model there is a significant loss of SOM-positive interneurons in the deep layers in parallel to the extracellular accumulation of A β , however the neuronal population expressing PV remains stable during the course of disease. In vitro studies demonstrated the resistance of the PV-positive neurons to toxic agents (primarily A β) present in the soluble S1 fraction of transgenic models.

Neurodegeneration of the SOM-positive neurons might result in a loss of inhibitory innervation receiving principal neurons, which can lead to an imbalance of inhibition/excitation ratio receiving these neurons and in consequence generating cognitive failures in learning and memory processes. The different vulnerability of PV-neurons in mice and patients, could be explained by the accumulation of soluble forms of phospho-tau and/or glial homeostasis dysfunction in AD patients.

☑ CHAPTER 5

Smoking Exacerbates Amyloid Pathology in a Mouse Model of Alzheimer's Disease

Nature Communication. 2013; 4: 1495. doi: 10.1038/ncomms2494

Several epidemiological studies have shown that cigarette smoking might alter the incidence of Alzheimer's disease. However, inconsistent results have been reported regarding the risk for AD among smokers. Previous studies in experimental animal models have reported that administration of some cigarette components (e.g. nicotine) alters amyloid- β aggregation, providing a possible link. However, extrapolation of these findings towards the *in vivo* scenario is not straightforward since smoke inhalation involves a number of other components. Here we analyze the effect of smoking under more relevant conditions. We expose AD transgenic mice to cigarette smoke and analyze the neuropathological alterations in comparison with animals not subjected to smoke inhalation. Our results show that smoking increases the severity of some abnormalities typical of AD, including amyloidogenesis, neuroinflammation and tau phosphorylation. Our findings suggest that cigarette smoking may increase AD onset and exacerbate its features and thus, may constitute an important environmental risk factor for AD.

Double transgenic APP/PS1 mice expressing two of the human genes associated to AD were exposed to different doses of cigarette smoke, five days per week, during four consecutive months. Pathological features of AD were measured and compared with the untreated control counterparts. Our results suggest that smoking increases amyloid deposition in a dose-dependent manner, by promoting the formation of new plaques and contributing to the maturation of amyloid deposits. Smoking also exacerbates gliosis, inducing microglial activation and reactive astrogliosis in the mice exposed to high doses of smoke. Neuroinflammatory response was exacerbated after smoke exposure and correlated with the increase of amyloid lesions. Exposure to smoke also induced alterations on tau phosphorylation around the amyloid plaques, which are considered a precursor of tangle formation. However, we could not find a decrease in neuronal density in smoke-exposed animals. Our findings provide direct evidence that cigarette smoking exacerbates some of the typical neuropathological alterations associated to AD *in vivo*. The mechanisms by which smoking increases the risk of AD abnormalities remain unclear. There are several possible pathways by which smoking may have this deleterious effect, including direct induction of protein misfolding and aggregation due to some of the smoking components, increase of oxidative stress, impairments of the proteostasis machinery, cerebrovascular damage, brain inflammation, etc. Further studies are needed to elucidate which of these different mechanisms operate and whether the same effect is also observed in humans.

Our results suggest that cigarette smoking may contribute to the accumulation of cerebral protein aggregates and, thus, may constitute an important environmental risk factor for AD and other protein misfolding diseases.

7. Bibliografía



- Adalbert R, Nogradi A, Babetto E, Janeckova L, Walker SA, Kerschensteiner M, Misgeld T, Coleman MP. 2009. Severely dystrophic axons at amyloid plaques remain continuous and connected to viable cell bodies. *Brain* **132**: 402-16.
- Aguzzi a., Barres B a., Bennett ML. 2013. Microglia: Scapegoat, Saboteur, or Something Else? *Science (80-)* **339**: 156-161.
- Ahmed OJ, Mehta MR. 2009. The hippocampal rate code: anatomy, physiology and theory. *Trends Neurosci* **32**: 329-338.
- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, McNagny KM, Rossi FM V. 2011. Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat Neurosci* **14**: 1142-9.
- Alzheimer, A. 1907. Über eine eigenartige Erlanlung der Hirninde. *Allgemeine Zeitzchrift Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin*, **64**:146-148
- Amaral DG, Witter MP. 1989. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* **31**: 571-591.
- Aminoff EM, Kveraga K, Bar M. 2013. The role of the parahippocampal cortex in cognition. *Trends Cogn Sci* **17**: 379-390.
- Ampuero I, Ros R, Royuela A, Abraira V, del Ser T, García-Ribas G, García de Yébenes J. 2008. Risk factors for dementia of Alzheimer type and aging-associated cognitive decline in a Spanish population based sample, and in brains with pathology confirmed Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **14**: 179-91.
- Andrade-Moraes CH, Oliveira-Pinto A V, Castro-Fonseca E, da Silva CG, Guimarães DM, Szczupak D, Parente-Bruno DR, Carvalho LRB, Polichiso L, Gomes B V, et al. 2013. Cell number changes in Alzheimer's disease relate to dementia, not to plaques and tangles. *Brain* **136**: 3738-52.
- 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.
- Arendt T. 2009. Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **118**: 167-79.
- Arriagada P V, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. 1992. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* **42**: 631-9.
- Ashe KH, Zahs KR. 2010. Probing the Biology of Alzheimer's Disease in Mice. *Neuron* **66**: 631-645.
- Atwood CS, Martins RN, Smith MA, Perry G. 2002. Senile plaque composition and posttranslational modification of amyloid- β peptide and associated proteins. *Peptides* **23**: 1343-1350.
- Avila-Muñoz E, Arias C. 2014. When astrocytes become harmful: Functional and inflammatory responses that contribute to Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* **18**: 29-40.
- 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, et al. 2010. Calretinin interneurons are early targets of extracellular amyloid- β pathology in PS1/ABPP Alzheimer mice hippocampus. *J Alzheimer's Dis* **21**: 119-132.
- Bagyinszky E, Youn YC, An SSA, Kim S. 2014. The genetics of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging* **9**: 535-51.
- Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. 2011. Alzheimer's disease. *Lancet* **377**: 1019-1031.
- Ballatore C, Lee VM-Y, Trojanowski JQ. 2007. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* **8**: 663-72.
- Baron R, Babcock A a., Nemirovsky A, Finsen B, Monsonogo A. 2014. Accelerated microglial pathology is associated with A β plaques in mouse models of Alzheimer's disease. *Ageing Cell* **13**: 584-595.
- Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TLS, Fagan AM, Goate A, Fox NC, Marcus DS, Cairns NJ, Xie X, Blazey TM, et al. 2012. Clinical and Biomarker Changes in Dominantly Inherited Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* **367**: 795-804.
- Bayer TA, Wirths O. 2010. Intracellular accumulation of amyloid-Beta - a predictor for synaptic dysfunction and neuron loss in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* **2**: 8.
- Beal MF, Benoit R, Mazurek MF, Bird ED, Martin JB. 1986. Somatostatin-281-12-like immunoreactivity is reduced in Alzheimer's disease cerebral cortex. *Brain Res* **368**: 380-383..

- Bell KFS, Claudio Cuello A. 2006. Altered synaptic function in Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol* **545**: 11-21.
- 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**: 349-357.
- Bhaskar K, Konerth M, Kokiko-Cochran ON, Cardona A, Ransohoff RM, Lamb BT. 2010. Regulation of tau pathology by the microglial fractalkine receptor. *Neuron* **68**: 19-31.
- Bilkei-Gorzo A. 2014. Genetic mouse models of brain ageing and Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther* **142**: 244-57.
- Birch AM, Katsouri L, Sastre M. 2014. Modulation of inflammation in transgenic models of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* **11**: 25.
- Bittner T, Burgold S, Dorostkar MM, Fuhrmann M, Wegenast-Braun BM, Schmidt B, Kretschmar H, Herms J. 2012. Amyloid plaque formation precedes dendritic spine loss. *Acta Neuropathol* **124**: 797-807.
- Blaizot X, Mansilla F, Insausti a. M, Constans JM, Salinas-Alamán a., Pró-Sistiaga P, Mohedano-Moriano a., Insausti R. 2010. The human parahippocampal region: I. temporal pole cytoarchitectonic and MRI correlation. *Cereb Cortex* **20**: 2198-2212.
- Blanchard V, Moussaoui S, Czech C, Touchet N, Bonici B, Planche M, Canton T, Jedidi I, Gohin M, Wirths O, et al. 2003. Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with A β deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp Neurol* **184**: 247-263.
- Blazquez-Llorca L, Garcia-Marin V, Defelipe J. 2010. Pericellular innervation of neurons expressing abnormally hyperphosphorylated tau in the hippocampal formation of Alzheimer's disease patients. *Front Neuroanat* **4**: 20.
- Blennow K, Leon MJ De, Zetterberg H. 2006. Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* **368**: 387-403.
- Borchelt DR, Ratovitski T, Van Lare J, Lee MK, Gonzales V, Jenkins N a., 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**: 939-945.
- Bose S, Cho J. 2013. Role of chemokine CCL2 and its receptor CCR2 in neurodegenerative diseases. *Arch Pharm Res* **36**: 1039-50.
- Boutajangout A, Authelet M, Blanchard V, Touchet N, Tremp G, Pradier L, Brion J-P. 2004. Characterisation of cytoskeletal abnormalities in mice transgenic for wild-type human tau and familial Alzheimer's disease mutants of APP and presenilin-1. *Neurobiol Dis* **15**: 47-60.
- Boutajangout A, Ingadottir J, Davies P, Sigurdsson EM. 2011. Passive immunization targeting pathological phospho-tau protein in a mouse model reduces functional decline and clears tau aggregates from the brain. *J Neurochem* **118**: 658-67.
- Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Tredici K. 2006. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol* **112**: 389-404.
- Braak H, Braak E. 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* **82**: 239-259.
- Braak H, Braak E, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. 1986. Occurrence of neuropil threads in the senile human brain and in Alzheimer's disease: A third location of paired helical filaments outside of neurofibrillary tangles and neuritic plaques. *Neurosci Lett* **65**: 351-355.
- Braak H, Zetterberg H, Del Tredici K, Blennow K. 2013. Intraneuronal tau aggregation precedes diffuse plaque deposition, but amyloid beta changes occur before increases of tau in cerebrospinal fluid. *Acta Neuropathol* **126**: 631-641.
- Bradshaw EM, Chibnik LB, Keenan BT, Ottoboni L, Raj T, Tang a, Rosenkrantz LL, Imboya S, Lee M, Von Korff a, et al. 2013. CD33 Alzheimer's disease locus: altered monocyte function and amyloid biology. *Nat Neurosci* **16**: 848-850.
- Brady D., Mufson E. 1997. Parvalbumin-immunoreactive neurons in the hippocampal formation of Alzheimer's diseased brain. *Neuroscience* **80**: 1113-1125.
- Breitner JC, Baker LD, Montine TJ, Meinert CL, Lyketsos CG, Ashe KH, Brandt J, Craft S, Evans DE, Green RC, et al. 2011. Extended results of the Alzheimer's disease anti-inflammatory prevention trial. *Alzheimers Dement* **7**: 402-11.

- Brouillette J, Caillierez R, Zommer N, Alves-Pires C, Benilova I, Blum D, De Strooper B, Buee L. 2012. Neurotoxicity and Memory Deficits Induced by Soluble Low-Molecular-Weight Amyloid-1-42 Oligomers Are Revealed In Vivo by Using a Novel Animal Model. *J Neurosci* **32**: 7852-7861.
- Buckley MJ. 2005. The role of the perirhinal cortex and hippocampus in learning, memory, and perception. *Q J Exp Psychol B* **58**: 246-268.
- Burgos-Ramos E, Hervás-Aguilar a., Aguado-Llera D, Puebla-Jiménez L, Hernández-Pinto a. M, Barrios V, Arilla-Ferreiro E. 2008. Somatostatin and Alzheimer's disease. *Mol Cell Endocrinol* **286**: 104-111.
- Burwell RD. 2001. Borders and cytoarchitecture of the perirhinal and postrhinal cortices in the rat. *J Comp Neurol* **437**: 17-41.
- Burwell RD. 2000. The parahippocampal region: corticocortical connectivity. *Ann N Y Acad Sci* **911**: 25-42.
- Burwell RD, Amaral DG. 1998. Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *J Comp Neurol* **398**: 179-205.
- Burwell RD, Witter MP, Amaral DG. 1995. Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: a review of the neuroanatomical literature and comparison with findings from the monkey brain. *Hippocampus* **5**: 390-408.
- Busche MA, Eichhoff G, Adelsberger H, Abramowski D, Wiederhold K-H, Haass C, Staufenbiel M, Konnerth A, Garaschuk O. 2008. Clusters of hyperactive neurons near amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science* **321**: 1686-9.
- Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, Gabriely G, Koeglsperger T, Dake B, Wu PM, Doykan CE, et al. 2014. Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci* **17**: 131-43.
- Buxbaum JD, Thinakaran G, Koliatsos V, O'Callahan J, Slunt HH, Price DL, Sisodia SS. 1998. Alzheimer Amyloid Protein Precursor in the Rat Hippocampus: Transport and Processing through the Perforant Path. *J Neurosci* **18**: 9629-9637.
- Buzsáki G. 2001. Hippocampal GABAergic Interneurons: A Physiological Perspective. *Neurochem Res* **26**: 899-905.
- Caballero C, Jimenez S, Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Gavilan MP, Ramos B, Del Rio JC, Vizuete M, Gutierrez A, et al. 2007. Inter-individual variability in the expression of the mutated form of hPS1M146L determined the production of A β peptides in the PS1xAPP transgenic mice. *J Neurosci Res* **85**: 787-797.
- Cai Z, Hussain MD, Yan L-J. 2015. Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Int J Neurosci*.
- Calero M, G \tilde{a} mez-Ramos A, Calero O, Soriano E, Avila J, Medina M. 2015. Additional mechanisms conferring genetic susceptibility to Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci* **9**: 1-9.
- Calero M, Rostagno A, Matsubara E, Zlokovic B, Frangione B, Ghiso J. 2000. Apolipoprotein J (clusterin) and Alzheimer's disease. *Microsc Res Tech* **50**: 305-15.
- Cardona AE, Piro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, Huang D, Kidd G, Dombrowski S, Dutta R, et al. 2006. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci* **9**: 917-24.
- Carriba P, Jimenez S, Navarro V, Moreno-Gonzalez I, Barneda-Zahonero B, Moubarak RS, Lopez-Soriano J, Gutierrez A, Vitorica J, Comella JX. 2015. Amyloid- β reduces the expression of neuronal FAIM-L, thereby shifting the inflammatory response mediated by TNF α from neuronal protection to death. *Cell Death Dis* **6**: e1639.
- Carter SF, Schöll M, Almkvist O, Wall A, Engler H, Långström B, Nordberg A. 2012. Evidence for astrocytosis in prodromal Alzheimer disease provided by 11C-deuterium-L-deprenyl: a multitracers PET paradigm combining 11C-Pittsburgh compound B and 18F-FDG. *J Nucl Med* **53**: 37-46.
- Castellani RJ, Rolston RK, Smith M a. 2010. Alzheimer disease. *Disease-a-Month* **56**: 484-546.
- Castro-Alvarez JF, Uribe-Arias SA, Mejía-Raigosa D, Cardona-Gómez GP. 2014. Cyclin-dependent kinase 5, a node protein in diminished tauopathy: a systems biology approach. *Front Aging Neurosci* **6**: 232.
- Chai X, Wu S, Murray TK, Kinley R, Cella C V, Sims H, Buckner N, Hanmer J, Davies P, O'Neill MJ, et al. 2011. Passive immunization with anti-Tau antibodies in two transgenic models: reduction of Tau pathology

- and delay of disease progression. *J Biol Chem* **286**: 34457-67.
- Chang RYK, Nouwens AS, Dodd PR, Etheridge N. 2013. The synaptic proteome in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **9**: 499-511.
- Cherry JD, Olschowka J a, O'Banion M. 2014. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation* **11**: 98.
- Chhor V, Le Charpentier T, Lebon S, Oré M-V, Celador IL, Josserand J, Degos V, Jacotot E, Hagberg H, Sävman K, et al. 2013. Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain Behav Immun* **32**: 70-85.
- Chiu IM, Morimoto ET a, Goodarzi H, Liao JT, O'Keeffe S, Phatnani HP, Muratet M, Carroll MC, Levy S, Tavazoie S, et al. 2013. A neurodegeneration-specific gene-expression signature of acutely isolated microglia from an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Cell Rep* **4**: 385-401.
- 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.
- 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.
- 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**: 189-193.
- Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Rimmler JB, Locke PA, Conneally PM, Schmechel KE. 1994. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet* **7**: 180-4.
- 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* **88**: 7552-7556.
- Crews L, Masliah E. 2010. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* **19**: R12-20.
- Crimins JL, Pooler A, Polydoro M, Luebke JI, Spires-Jones TL. 2013. The intersection of amyloid β and tau in glutamatergic synaptic dysfunction and collapse in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev* **12**: 757-63.
- Cruchaga C, Karch CM, Jin SC, Benitez BA, Cai Y, Guerreiro R, Harari O, Norton J, Budde J, Bertelsen S, et al. 2014. Rare coding variants in the phospholipase D3 gene confer risk for Alzheimer's disease. *Nature* **505**: 550-4.
- Cummings JL, Dubois B, Molinuevo JL, Scheltens P. 2013. International Work Group criteria for the diagnosis of Alzheimer disease. *Med Clin North Am* **97**: 363-8.
- Cunningham C. 2013. Microglia and neurodegeneration: The role of systemic inflammation. *Glia* **61**: 71-90.
- d'Abramo C, Acker CM, Jimenez HT, Davies P. 2013. Tau passive immunotherapy in mutant P301L mice: antibody affinity versus specificity. *PLoS One* **8**: e62402.
- D'Andrea MR, Nagele RG. 2010. Morphologically distinct types of amyloid plaques point the way to a better understanding of Alzheimer's disease pathogenesis. *Biotech Histochem* **85**: 133-147.
- David DC, Layfield R, Serpell L, Narain Y, Goedert M, Spillantini MG. 2002. Proteasomal degradation of tau protein. *J Neurochem* **83**: 176-185.
- Dawson HN, Cantillana V, Jansen M, Wang H, Vitek MP, Wilcock DM, Lynch JR, Laskowitz DT. 2010. Loss of tau elicits axonal degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* **169**: 516-31. 5).
- De Felice FG, Ferreira ST. 2014. Inflammation, defective insulin signaling, and mitochondrial dysfunction as common molecular denominators connecting type 2 diabetes to Alzheimer disease. *Diabetes* **63**: 2262-72.
- De Felice FG, Velasco PT, Lambert MP, Viola K, Fernandez SJ, Ferreira ST, Klein WL. 2007. Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J Biol Chem* **282**: 11590-601.
- De Felice FG, Wu D, Lambert MP, Fernandez SJ, Velasco PT, Lacor PN, Bigio EH, Jerecic J, Acton PJ, Shughrue PJ, et al. 2008. Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers. *Neurobiol Aging* **29**: 1334-47.

- De la Torre JC. 2002. Alzheimer disease as a vascular disorder: nosological evidence. *Stroke* **33**: 1152-62.
- De la Torre JC. 2006. How do heart disease and stroke become risk factors for Alzheimer's disease? *Neurol Res* **28**: 637-44.
- De Strooper B. 2010. Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. *Physiol Rev* **90**: 465-494.
- DeFelipe J. 1999. Chandelier cells and epilepsy. *Brain* **122**: 1807-1822.
- DeFelipe J, López-Cruz PL, Benavides-Piccione R, Bielza C, Larrañaga P, Anderson S, Burkhalter A, Cauli B, Fairén A, Feldmeyer D, et al. 2013. New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nat Rev Neurosci* **14**: 202-16.
- 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**: 41-7.
- Di Paolo C, Reverte I, Colomina MT, Domingo JL, Gómez M. 2014. Chronic exposure to aluminum and melatonin through the diet: neurobehavioral effects in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Food Chem Toxicol* **69**: 320-9.
- Dickson DW, Crystal HA, Bevana C, Honer W, Vincent J, Davies P. 1995. Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly. *Neurobiol Aging* **16**: 285-298.
- 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**: 100-10.
- Dickson TC, Vickers JC. 2001. The morphological phenotype of beta-amyloid plaques and associated neuritic changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience* **105**: 99-107.
- Doens D, Fernández PL. 2014. Microglia receptors and their implications in the response to amyloid β for Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neuroinflammation* **11**: 48.
- Dohler F, Sepulveda-Falla D, Krasemann S, Altmeyen H, Schlüter H, Hildebrand D, Zerr I, Matschke J, Glatzel M. 2014. High molecular mass assemblies of amyloid- β oligomers bind prion protein in patients with Alzheimer's disease. *Brain* **137**: 873-86.
- Druga R. 2009. Neocortical inhibitory system. *Folia Biol (Praha)* **55**: 201-217.
- Dutar P, Bassant M. 1995. The septohippocampal pathway: structure and function of a central cholinergic system. *Physiol*
- Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC. 2009. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* **118**: 5-36.
- Duyckaerts C, Potier M-C, Delatour B. 2008. *Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences.*
- Einstein EB, Patterson C a, Hon BJ, Regan K a, Reddi J, Melnikoff DE, Mateer MJ, Schulz S, Johnson BN, Tallent MK. 2010. Somatostatin signaling in neuronal cilia is critical for object recognition memory. *J Neurosci* **30**: 4306-4314.
- Elder GA, Gama Sosa MA, De Gasperi R. 2010. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med* **77**: 69-81.
- Epelbaum J, Dournaud P, Fodor M, Viollet C. 1994. The neurobiology of somatostatin. *Crit Rev Neurobiol* **8**: 25-44.
- Epelbaum J, Guillou JL, Gastambide F, Hoyer D, Duron E, Viollet C. 2009. Somatostatin, Alzheimer's disease and cognition: An old story coming of age? *Prog Neurobiol* **89**: 153-161.
- Esparza TJ, Zhao H, Cirrito JR, Cairns NJ, Bateman RJ, Holtzman DM, Brody DL. 2013. Amyloid-beta oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls. *Ann Neurol* **73**: 104-119.
- Evin G, Weidemann A. 2002. Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease A β amyloid peptides. *Peptides* **23**: 1285-1297.
- Farris W, Schütz SG, Cirrito JR, Shankar GM, Sun X, George A, Leissring M a, Walsh DM, Qiu WQ, Holtzman DM, et al. 2007. Loss of neprilysin function promotes amyloid plaque formation and causes cerebral amyloid angiopathy. *Am J Pathol* **171**: 241-251.
- Fedorcsák I, Ehrenberg L. 1966. Effects of diethyl pyrocarbonate and methyl methanesulfonate on

- nucleic acids and nucleases. *Acta Chem Scand* **20**: 107-12.
- Fernandez AM, Jimenez S, Mecha M, Dávila D, Guaza C, Vitorica J, Torres-Aleman I. 2012. Regulation of the phosphatase calcineurin by insulin-like growth factor I unveils a key role of astrocytes in Alzheimer's pathology. *Mol Psychiatry* **17**: 705-18.
- Ferreiro E, Oliveira CR, Pereira CMF. 2008. The release of calcium from the endoplasmic reticulum induced by amyloid-beta and prion peptides activates the mitochondrial apoptotic pathway. *Neurobiol Dis* **30**: 331-42.
- Ferrer I, Soriano E, Tuñón T, Fonseca M, Guionnet N. 1991. Parvalbumin immunoreactive neurons in normal human temporal neocortex and in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* **106**: 135-141.
- Ferrer I, Zújar MJ, Rivera R, Soria M, Vidal A, Casas R. 1993. Parvalbumin-immunoreactive dystrophic neurites and aberrant sprouts in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **158**: 163-166.
- Fiala JC. 2007. Mechanisms of amyloid plaque pathogenesis. *Acta Neuropathol* **114**: 551-571.
- Fillenbaum GG, van Belle G, Morris JC, Mohs RC, Mirra SS, Davis PC, Tariot PN, Silverman JM, Clark CM, Welsh-Bohmer K a., et al. 2008. Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD): The first twenty years. *Alzheimer's Dement* **4**: 96-109.
- Flachsbart F, Caliebe 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* **18**: 59-61.
- Flanary B, Sammons N. 2007. Evidence that aging and amyloid promote microglial cell senescence. *Rejuvenation*
- Frost B, Götz J, Feany MB. 2015. Connecting the dots between tau dysfunction and neurodegeneration. *Trends Cell Biol* **25**: 46-53.
- Furman JL, Sama DM, Gant JC, Beckett TL, Murphy MP, Bachstetter AD, Van Eldik LJ, Norris CM. 2012. Targeting astrocytes ameliorates neurologic changes in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* **32**: 16129-40.
- Furtak SC, Moyer JR, Brown TH. 2007a. Morphology and ontogeny of rat perirhinal cortical neurons. *J Comp Neurol* **505**: 493-510.
- Furtak SC, Wei S-M, Agster KL, Burwell RD. 2007b. Functional neuroanatomy of the parahippocampal region in the rat: the perirhinal and postrhinal cortices. *Hippocampus* **17**: 709-22.
- Gahete MD, Rubio A, Durán-Prado M, Avila J, Luque RM, Castao JP. 2010. Expression of somatostatin, cortistatin, and their receptors, as well as dopamine receptors, but not of neprilysin, are reduced in the temporal lobe of alzheimer's disease patients. *J Alzheimer's Dis* **20**: 465-475.
- Gaikwad S, Larionov S, Wang Y, Dannenberg H, Matozaki T, Monsonogo A, Thal DR, Neumann H. 2009. Signal regulatory protein-beta1: a microglial modulator of phagocytosis in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **175**: 2528-2539.
- Gao L, Tian S, Gao H, Xu Y. 2013. Hypoxia increases A β -induced tau phosphorylation by calpain and promotes behavioral consequences in AD transgenic mice. *J Mol Neurosci* **51**: 138-47.
- Garcia-Alloza M, Borrelli LA, Hyman BT, Bacskai BJ. 2010. Antioxidants have a rapid and long-lasting effect on neuritic abnormalities in APP:PS1 mice. *Neurobiol Aging* **31**: 2058-68.
- Garcia-Alloza M, Robbins EM, Zhang-Nunes SX, Purcell SM, Betensky R a., Raju S, Prada C, Greenberg SM, Bacskai BJ, Frosch MP. 2006. Characterization of amyloid deposition in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol Dis* **24**: 516-524.
- 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.
- Gauthier E, Fortier I, Courchesne F, Pepin P, Mortimer J, Gauvreau D. 2000. Aluminum forms in drinking water and risk of Alzheimer's disease. *Environ Res* **84**: 234-46.
- Gavilán MP, Pintado C, Gavilán E, Jiménez S, Ríos RM, Vitorica J, Castaño A, Ruano D. 2009. Dysfunction of the unfolded protein response increases neurodegeneration in aged rat hippocampus following proteasome inhibition. *Aging Cell* **8**: 654-65.

- Geddes JW, Anderson KJ, Cotman CW. 1986. Senile plaques as aberrant sprout-stimulating structures. *Exp Neurol* **94**: 767-776.
- Gendreau KL, Hall GF. 2013. Tangles, Toxicity, and Tau Secretion in AD - New Approaches to a Vexing Problem. *Front Neurol* **4**: 160.
- Gendron TF, Petrucelli L. 2009. The role of tau in neurodegeneration. *Mol Neurodegener* **4**: 13.
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L. 1991. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* **349**: 704-6.
- 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* **17**: 24.
- Gomez-Isla T, Price JL, McKeel Jr. DW, 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.
- Gómez-Nicola D, Fransen NL, Suzzi S, Perry VH. 2013. Regulation of microglial proliferation during chronic neurodegeneration. *J Neurosci* **33**: 2481-93.
- Gomez-Nicola D, Perry VH. 2014. Microglial Dynamics and Role in the Healthy and Diseased Brain: A Paradigm of Functional Plasticity. *Neuroscientist*.
- Gonchar Y, Wang Q, Burkhalter A. 2007. Multiple distinct subtypes of GABAergic neurons in mouse visual cortex identified by triple immunostaining. *Front Neuroanat* **1**: 3.
- Götz J. 2001. Tau and transgenic animal models. *Brain Res Rev* **35**: 266-286.
- Gouras GK, Almeida CG, Takahashi RH. 2005. Intraneuronal Abeta accumulation and origin of plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **26**: 1235-44.
- Grathwohl SA, Kälin RE, Bolmont T, Prokop S, Winkelmann G, Kaeser SA, Odenthal J, Radde R, Eldred T, Gandy S, et al. 2009. Formation and maintenance of Alzheimer's disease beta-amyloid plaques in the absence of microglia. *Nat Neurosci* **12**: 1361-3.
- Green KN, LaFerla FM. 2008. Linking calcium to Abeta and Alzheimer's disease. *Neuron* **59**: 190-4.
- Greter M, Lelios I, Croxford AL. 2015. Microglia Versus Myeloid Cell Nomenclature during Brain Inflammation. *Front Immunol* **6**: 1-7.
- Griciuc A, Serrano-Pozo A, Parrado AR, Lesinski AN, Asselin CN, Mullin K, Hooli B, Choi S, Hyman BT, Tanzi RE. 2013. Alzheimer's disease risk gene cd33 inhibits microglial uptake of amyloid beta. *Neuron* **78**: 631-643.
- 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.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M. 1986. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol*
- Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, Carrasquillo M, Rogava E, Majounie E, Cruchaga C, Sassi C, Kauwe JSK, Younkin S, et al. 2013. TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N Engl J Med* **368**: 117-27.
- GUNDERSEN HJG, JENSEN EB V., KIEU K, NIELSEN J. 1999. The efficiency of systematic sampling in stereology - reconsidered. *J Microsc* **193**: 199-211.
- Gunten A Von, Kövari E, Bussièrè T, Rivara CB, Gold G, Bouras C, Hof PR, Giannakopoulos P. 2006. Cognitive impact of neuronal pathology in the entorhinal cortex and CA1 field in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **27**: 270-277.
- 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.
- Hamano T, Gendron TF, Causevic E, Yen S-H, Lin W-L, Isidoro C, Deture M, Ko L. 2008. Autophagic-lysosomal perturbation enhances tau aggregation in transfectants with induced wild-type tau expression. *Eur J Neurosci* **27**: 1119-30.
- Hanisch U-K, Kettenmann H. 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* **10**: 1387-94.

- Hardy J, Allsop D. 1991. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* **12**: 383-388.
- Hardy JA, Higgins GA. 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**: 184-5.
- Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskvin V, Dowzell K, Williams A, et al. 2009. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* **41**: 1088-93.
- Haskins a. L, Yonelinas AP, Quamme JR, Ranganath C. 2008. Perirhinal Cortex Supports Encoding and Familiarity-Based Recognition of Novel Associations. *Neuron* **59**: 554-560.
- Head E, Garzon-Rodriguez W, Johnson JK, Lott IT, Cotman CW, Glabe C. 2001. Oxidation of A β and plaque biogenesis in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Neurobiol Dis* **8**: 792-806. 5).
- Heneka MT, Carson MJ, Khoury J El, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, Jacobs AH, Wyss-Coray T, Vitorica J, Ransohoff RM, et al. 2015a. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* **14**: 388-405.
- Heneka MT, Golenbock DT, Latz E. 2015b. Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Immunol* **16**: 229-236.
- Heneka MT, Kummer MP, Latz E. 2014. Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol* **14**: 463-77. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24962261>.
- Heneka MT, O'Banion MK. 2007. Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* **184**: 69-91.
- Heneka MT, O'Banion MK, Terwel D, Kummer MP. 2010. Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* **117**: 919-47. 2015).
- Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B. 2015. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* **16**: 358-372.
- Herrup K. 2015. The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat Neurosci* **18**: 794-799.
- 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**: 8354-60.
- Hickman SE, El Khoury J. 2014. TREM2 and the neuroimmunology of Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol* **88**: 495-8.
- Hickman SE, Kingery ND, Ohsumi TK, Borowsky ML, Wang L, Means TK, El Khoury J. 2013. The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nat Neurosci* **16**: 1896-905.
- 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**: 401-412.
- Hirano A. 1994. Hirano bodies and related neuronal inclusions. *Neuropathol Appl Neurobiol* **20**: 3-11.
- Hoe H-S, Rebeck GW. 2008. Functional interactions of APP with the apoE receptor family. *J Neurochem* **106**: 2263-71.
- Hof PR, Bussière T, Gold G, Kövari E, Giannakopoulos P, Bouras C, Perl DP, Morrison JH. 2003. Stereologic evidence for persistence of viable neurons in layer II of the entorhinal cortex and the CA1 field in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **62**: 55-67.
- Hof PR, Cox K, Young WG, Celio MR, Rogers J, Morrison JH. 1991. Parvalbumin-immunoreactive neurons in the neocortex are resistant to degeneration in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **50**: 451-62.
- Hoover BR, Reed MN, Su J, Penrod RD, Kotilinek LA, Grant MK, Pitstick R, Carlson GA, Lanier LM, Yuan L-L, et al. 2010. Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron* **68**: 1067-81.
- Howard V, Reed M. 2004. *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*.
- Howlett DR, Bowler K, Soden PE, Riddell D, Davis JB, Richardson JC, Burbidge SA, Gonzalez MI, Irving EA, Lawman A, et al. AB deposition and related pathology in an APP x PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. 5).
- Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Carrillo MC, Dickson DW, Duyckaerts C, Frosch MP, Masliah E, et al. 2012. National Institute on Aging-

- Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **8**: 1-13.
- Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR, Barnes CL. 1984. Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science* **225**: 1168-70.
- Iacono D, Resnick SM, O'Brien R, Zonderman AB, An Y, Pletnikova O, Rudow G, Crain B, Troncoso JC. 2014. Mild Cognitive Impairment and Asymptomatic Alzheimer Disease Subjects: Equivalent β -Amyloid and Tau Loads With Divergent Cognitive Outcomes. *J Neuropathol Exp Neurol* **73**: 295-304.
- Iilff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, Benveniste H, Vates GE, Deane R, Goldman SA, et al. 2012. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Transl Med* **4**: 147ra111.
- Imai F, Suzuki H, Oda J, Ninomiya T, Ono K, Sano H, Sawada M. 2007. Neuroprotective effect of exogenous microglia in global brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **27**: 488-500.
- Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention. *J Cell Mol Med* **12**: 38-55.
- Iqbal K, Liu F, Gong C-X. 2014. Alzheimer disease therapeutics: focus on the disease and not just plaques and tangles. *Biochem Pharmacol* **88**: 631-9.
- Iqbal K, Liu F, Gong C-X, Grundke-Iqbal I. 2010. Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Curr Alzheimer Res* **7**: 656-64.
- Itagaki S, McGeer P, Akiyama H, Zhu s, Selkoe d. 1989. Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Neuroimmunol* **24**: 173-182..
- Iwata N, Takaki Y, Fukami S, Tsubuki S, Saido TC. 2002. Region-specific reduction of A beta-degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse hippocampus upon aging. *J Neurosci Res* **70**: 493-500.
- Jacobsen JS, Wu C-C, Redwine JM, Comery T a, Arias R, Bowlby M, Martone R, Morrison JH, Pangalos MN, Reinhart PH, et al. 2006. Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 5161-5166.
- Jahn H. 2013. Memory loss in Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci* **15**: 445-54.
- Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins N a., Copeland NG, Lee MK, Younkin LH, Wagner SL, et al. 2004. Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β -amyloid peptide in vivo: Evidence for augmentation of a 42-specific γ secretase. *Hum Mol Genet* **13**: 159-170.
- Jaturapatporn D, Isaac MGEKN, McCleery J, Tabet N. 2012. Aspirin, steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *Cochrane database Syst Rev* **2**: CD006378.
- Jay TR, Miller CM, Cheng PJ, Graham LC, Bemiller S, Broihier ML, Xu G, Margevicius D, Karlo JC, Sousa GL, et al. 2015. TREM2 deficiency eliminates TREM2+ inflammatory macrophages and ameliorates pathology in Alzheimer's disease mouse models. *J Exp Med* **212**: 287-295.
- Jessen NA, Munk ASF, Lundgaard I, Nedergaard M. 2015. The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochem Res*.
- Jicha GA, Abner EL, Schmitt FA, Kryscio RJ, Riley KP, Cooper GE, Stiles N, Mendiondo MS, Smith CD, Van Eldik LJ, et al. 2012. Preclinical AD Workgroup staging: pathological correlates and potential challenges. *Neurobiol Aging* **33**: 622.e1-622.e16.
- 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/APP751S1L mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *J Neurosci* **28**: 11650-11661.
- Jimenez S, Navarro V, Moyano J, Sanchez-Mico M, Torres M, Davila JC, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J. 2014. Disruption of amyloid plaques integrity affects the soluble oligomers content from Alzheimer disease brains. *PLoS One* **9**: e114041.).
- Jimenez S, Torres M, Vizuete M, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Trujillo-Estrada L, Carmona-Cuenca I, Caballero C, Ruano D, Gutierrez A, et al. 2011. Age-dependent accumulation of soluble Abeta oligomers reverses the neuroprotective effect of sAPP α by modulating PI3K/Akt-GSK-3 β pathway in Alzheimer mice 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 U S A* **108**: 5819-24..
- Johansen FF, Zimmer J, Diemer NH. 1987. Early loss of somatostatin neurons in dentate hilus after cerebral ischemia in the rat precedes CA-1 pyramidal cell loss. *Acta Neuropathol* **73**: 110-114.
- Kalaria RN. 2003. Vascular factors in Alzheimer's disease. *Int Psychogeriatr* **15 Suppl 1**: 47-52.
- Kan MJ, Lee JE, Wilson JG, Everhart AL, Brown CM, Hoofnagle AN, Jansen M, Vitek MP, Gunn MD, Colton CA. 2015. Arginine deprivation and immune suppression in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* **35**: 5969-82.
- Kaneko Y, Kitamoto T, Tateishi J, Yamaguchi K. 1989. Ferritin immunohistochemistry as a marker for microglia. *Acta Neuropathol* **79**: 129-136..
- Karch CM, Cruchaga C, Goate AM. 2014. Alzheimer's disease genetics: From the bench to the clinic. *Neuron* **83**:
- 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**: 698-712.
- Katzman R. 1976. The Prevalence and Malignancy of Alzheimer Disease. *Arch Neurol* **33**: 217..
- Kawaguchi Y, Kondo S. 2002. Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex. *J Neurocytol* **31**: 277-287.
- Kepecs A, Fishell G. 2014. Interneuron cell types are fit to function. *Nature* **505**: 318-26.
- Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A. 2013. Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron* **77**: 10-18.
- Kim D, Tsai LH. 2009. Bridging Physiology and Pathology in AD. *Cell* **137**: 997-1000.
- Kim DH, Yeo SH, Park J-M, Choi JY, Lee T-H, Park SY, Ock MS, Eo J, Kim H-S, Cha H-J. 2014. Genetic markers for diagnosis and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Gene* **545**: 185-93.
- Kim M, Suh J, Romano D, Truong MH, Mullin K, Hooli B, Norton D, Tesco G, Elliott K, Wagner SL, et al. 2009. Potential late-onset Alzheimer's disease-associated mutations in the ADAM10 gene attenuate {alpha}-secretase activity. *Hum Mol Genet* **18**: 3987-96.
- Kluge C, Stoppel C, Szinyei C, Stork O, Pape H-C. 2008. Role of the somatostatin system in contextual fear memory and hippocampal synaptic plasticity. *Learn Mem* **15**: 252-260.
- Koffie RM, Meyer-Luehmann M, Hashimoto T, Adams KW, Mielke ML, Garcia-Alloza M, Micheva KD, Smith SJ, Kim ML, Lee VM, et al. 2009. Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 4012-7.
- Kokjohn T a, Roher AE. 2009. Amyloid precursor protein transgenic mouse models and Alzheimer's disease: understanding the paradigms, limitations, and contributions. *Alzheimers Dement* **5**: 340-347.
- Kolarova M, García-Sierra F, Bartos A, Ricny J, Ripova D. 2012. Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease. *Int J Alzheimers Dis* **2012**.
- 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
- Korotzer A, Pike C, Cotman C. 1993. β -Amyloid peptides induce degeneration of cultured rat microglia. *Brain Res.*
- Kovacs GG, Gelpi E. 2012. Clinical Neuropathology Practice News 3-2012: the ABC in AD, a revised and updated guideline for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Clin Neuropathol* **31**: 116-118.
- 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**.
- Krafft GA, Klein WL. 2010. ADDLs and the signaling web that leads to Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* **59**: 230-42.
- Kraft AW, Hu X, Yoon H, Yan P, Xiao Q, Wang Y, Gil SC, Brown J, Wilhelmsson U, Restivo JL, et al. 2013.

- Attenuating astrocyte activation accelerates plaque pathogenesis in APP/PS1 mice. *FASEB J* **27**: 187-98.
- Kuchibhotla K V, Wegmann S, Kopeikina KJ, Hawkes J, Rudinskiy N, Andermann ML, Spires-Jones TL, Bacskai BJ, Hyman BT. 2014. Neurofibrillary tangle-bearing neurons are functionally integrated in cortical circuits in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 510-4.
- Kumar U. 2005a. Expression of somatostatin receptor subtypes (SSTR1-5) in Alzheimer's disease brain: An immunohistochemical analysis. *Neuroscience* **134**: 525-538.
- Kumar U. 2005b. Expression of somatostatin receptor subtypes (SSTR1-5) in Alzheimer's disease brain: An immunohistochemical analysis. *Neuroscience* **134**: 525-538.
- Lambert JC, Ibrahim-Verbaas C a, Harold D, Naj a C, Sims R, Bellenguez C, DeStafano a L, Bis JC, Beecham GW, Grenier-Boley B, et al. 2013. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet* **45**: 1452-8.
- Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, Edwards C, Freed R, Liosatos M, Morgan TE, Rozovsky I, Trommer B, Viola KL, et al. 1998. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 6448-6453.
- Lannfelt L, Relkin NR, Siemers ER. 2014. Amyloid- β -directed immunotherapy for Alzheimer's disease. *J Intern Med* **275**: 284-95.
- Lasagna-Reeves C a., Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Sarmiento J, Troncoso J, Jackson GR, Kaye R. 2012. Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease. *FASEB J* **26**: 1946-1959.
- Latta CH, Brothers HM, Wilcock DM. 2014. Neuroinflammation in Alzheimer's disease; A source of heterogeneity and target for personalized therapy. *Neuroscience*.
- Laurén J, Gimbel D a, Nygaard HB, Gilbert JW, Strittmatter SM. 2009. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* **457**: 1128-1132.
- Lazarov O, Lee M, Peterson DA, Sisodia SS. 2002. Evidence that synaptically released beta-amyloid accumulates as extracellular deposits in the hippocampus of transgenic mice. *J Neurosci* **22**: 9785-93.
- Lee CYD, Landreth GE. 2010. The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J Neural Transm* **117**: 949-60.
- Lee J-E, Han P-L. 2013. An update of animal models of Alzheimer disease with a reevaluation of plaque depositions. *Exp Neurobiol* **22**: 84-95.
- Lee JH, Yu WH, Kumar A, Lee S, Mohan PS, Peterhoff CM, Wolfe DM, Martinez-Vicente M, Massey AC, Sovak G, et al. 2010. Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell* **141**: 1146-1158.
- Leuba G, Kraftsik R, Saini K. 1998. Quantitative distribution of parvalbumin, calretinin, and calbindin D-28k immunoreactive neurons in the visual cortex of normal and Alzheimer cases. *Exp Neurol* **152**: 278-91.
- Levenga J, Krishnamurthy P, Rajamohamedsait H, Wong H, Franke TF, Cain P, Sigurdsson EM, Hoeffler CA. 2013. Tau pathology induces loss of GABAergic interneurons leading to altered synaptic plasticity and behavioral impairments. *Acta Neuropathol Commun* **1**: 34.).
- Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW. 2005. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* **6**: 312-24.
- Li Y, Tan M-S, Jiang T, Tan L. 2014. Microglia in Alzheimer's disease. *Biomed Res Int* **2014**: 437483.).
- Lin W-L, Lewis J, Yen S-H, Hutton M, Dickson DW. 2003. Ultrastructural neuronal pathology in transgenic mice expressing mutant (P301L) human tau. *J Neurocytol* **32**: 1091-105.
- Lopes KO, Sparks DL, Streit WJ. 2008. Microglial dystrophy in the aged and Alzheimer's disease brain is associated with ferritin immunoreactivity. *Glia* **56**: 1048-1060.
- López-González I, Schlüter A, Aso E, Garcia-Esparcia P, Ansoleaga B, Llorens F, Carmona M, Moreno J, Fuso A, Portero-Otin M, et al. 2015. Neuroinflammatory signals in Alzheimer disease and APP/PS1 transgenic mice: correlations with plaques, tangles, and oligomeric species. *J Neuropathol Exp Neurol* **74**: 319-44.

- Lowenstein D, Thomas M, Smith D, McIntosh T. 1992. Selective vulnerability of dentate hilar neurons following traumatic brain injury: a potential mechanistic link between head trauma and disorders of the hippocampus. *J Neurosci* **12**: 4846-4853.
- Lue L-F, Schmitz C, Walker DG. 2014. What happens to microglial TREM2 in Alzheimer's disease: Immunoregulatory turned into immunopathogenic? *Neuroscience* **2**.
- Maccioni RB, Muñoz JP, Barbeito L. 2001. The Molecular Bases of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Arch Med Res* **32**: 367-381.
- Machová E, Rudajev V, Smycková H, Koivisto H, Tanila H, Dolezal V. 2010. Functional cholinergic damage develops with amyloid accumulation in young adult APP^{swe}/PS1^{dE9} transgenic mice. *Neurobiol Dis* **38**: 27-35.
- Magdesian MH, Carvalho MMVF, Mendes FA, Saraiva LM, Juliano MA, Juliano L, Garcia-Abreu J, Ferreira ST. 2008. Amyloid-beta binds to the extracellular cysteine-rich domain of Frizzled and inhibits Wnt/beta-catenin signaling. *J Biol Chem* **283**: 9359-68.
- Mai JK, Paxinos G, Voss T. 2007. The human brain atlas. *Academic Press*.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. 2004. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* **5**: 793-807.
- Marr RA, Hafez DM. 2014. Amyloid-beta and Alzheimer's disease: the role of neprilysin-2 in amyloid-beta clearance. *Front Aging Neurosci* **6**: 187.
- Martins IC, Kuperstein I, Wilkinson H, Maes E, Vanbrabant M, Jonckheere W, Van Gelder P, Hartmann D, D'Hooge R, De Strooper B, et al. 2008. Lipids revert inert Abeta amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice. *EMBO J* **27**: 224-33.
- Masliah E, Mallory M, Alford M, DeTeresa R, Hansen LA, McKeel DW, Morris JC. 2001. Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology* **56**: 127-129.
- Masliah E, Mallory M, Hansen L, Alford M, Albright T, DeTeresa R, Terry R, Baudier J, Saitoh T. 1991. Patterns of aberrant sprouting in alzheimer's disease. *Neuron* **6**: 729-739.
- Matsuoka N, Yamazaki M, Yamaguchi I. 1995. Changes in brain somatostatin in memory-deficient rats: comparison with cholinergic markers. *Neuroscience* **66**: 617-26.
- Mattson MP. 2007. Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell* **6**: 337-50.
- Mattson MP. 2004. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* **430**: 631-639.
- Mattson MP, Cheng B, Culwell AR, Esch FS, Lieberburg I, Rydel RE. 1993. Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the β -amyloid precursor protein. *Neuron* **10**: 243-254.
- Mc Donald JM, Savva GM, Brayne C, Welzel AT, Forster G, Shankar GM, Selkoe DJ, Ince PG, Walsh DM. 2010. The presence of sodium dodecyl sulphate-stable Abeta dimers is strongly associated with Alzheimer-type dementia. *Brain* **133**: 1328-41.
- McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, Klunk WE, Koroshetz WJ, Manly JJ, Mayeux R, et al. 2011. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement* **7**: 263-269.
- Medina M, Avila J. 2014. New perspectives on the role of tau in Alzheimer's disease. Implications for therapy. *Biochem Pharmacol* **88**: 540-7..
- Meinert CL, McCaffrey LD, Breitner JCS. 2009. Alzheimer's Disease Anti-inflammatory Prevention Trial: design, methods, and baseline results. *Alzheimers Dement* **5**: 93-104.
- Meyer-Luehmann M, Mielke M, Spires-Jones TL, Stoothoff W, Jones P, Bacskai BJ, Hyman BT. 2009. A reporter of local dendritic translocation shows plaque-related loss of neural system function in APP-transgenic mice. *J Neurosci* **29**: 12636-40.
- Meyer-Luehmann M, Spires-Jones TL, Prada C, Garcia-Alloza M, de Calignon A, Rozkalne A, Koenigsknecht-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**: 720-724.

- 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.
- Minkeviciene R, Ihalainen J, Malm T, Matilainen O, Keksa-Goldsteine V, Goldsteins G, Iivonen H, Leguit N, Glennon J, Koistinaho J, et al. 2008. Age-related decrease in stimulated glutamate release and vesicular glutamate transporters in APP/PS1 transgenic and wild-type mice. *J Neurochem* **105**: 584-94.
- Mirra S, Heyman A, McKeel D, Sumi S. 1991. The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CREAD). Part II. standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* **46**: 142-145. t.
- Mitew S, Kirkcaldie MTK, Dickson TC, Vickers JC. 2013. Altered synapses and gliotransmission in Alzheimer's disease and AD model mice. *Neurobiol Aging* **34**: 2341-51.
- Mizuno T. 2012. The biphasic role of microglia in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis* **2012**.
- Montine TJ, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Dickson DW, Duyckaerts C, Frosch MP, Masliah E, Mirra SS, et al. 2012. National institute on aging-Alzheimer's association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: A practical approach. *Acta Neuropathol* **123**: 1-11.
- Moolman DL, Vitolo O V, Vonsattel J-PG, Shelanski ML. 2004. Dendrite and dendritic spine alterations in Alzheimer models. *J Neurocytol* **33**: 377-87.
- Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. 2013. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol* **13**: 709-21.
- Morales I, Guzmán-Martínez L, Cerda-Troncoso C, Fariás 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, Fleming A, Imarisio S, Lopez Ramirez A, Mercer JL, Jimenez-Sanchez M, Bento CF, Puri C, Zavodszky E, Siddiqi F, et al. 2014. PICALM modulates autophagy activity and tau accumulation. *Nat Commun* **5**: 4998.
- 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, et al. 2009. Extracellular amyloid-beta and cytotoxic glial activation induce significant entorhinal neuron loss in young PS1M146L/APP751SL mice. *J Alzheimer's Dis* **18**: 755-776.
- Moreno-Gonzalez I, Estrada LD, Sanchez-Mejias E, Soto C. 2013. Smoking exacerbates amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Commun* **4**: 1495.
- Morris GP, Clark IA, Vissel B. 2014. Inconsistencies and controversies surrounding the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun* **2**: 135.
- Morrisette D a., Parachikova A, Green KN, LaFerla FM. 2009. Relevance of transgenic mouse models to human Alzheimer disease. *J Biol Chem* **284**: 6033-6037.
- Mosher KI, Wyss-Coray T. 2014. Microglial dysfunction in brain aging and Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol* **88**: 594-604.
- 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**: 4050-8.
- Mueller-Steiner S, Zhou Y, Arai H, Roberson ED, Sun B, Chen J, Wang X, Yu G, Esposito L, Mucke L, et al. 2006. Anti-amyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications for Alzheimer's disease. *Neuron* **51**: 703-14.
- Mufson EJ, Ginsberg SD, Ikonovic MD, DeKosky ST. 2003. Human cholinergic basal forebrain: chemoanatomy and neurologic dysfunction. *J Chem Neuroanat* **26**: 233-242.
- Müller U, Winter P, Graeber MB. 2013. A presenilin 1 mutation in the first case of Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* **12**: 129-30.
- Müller UC, Zheng H. 2012. Physiological functions of APP family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**: a006288.
- Murray E a, Graham KS, Gaffan D. 2005. Perirhinal cortex and its neighbours in the medial temporal lobe:

- contributions to memory and perception. *Q J Exp Psychol B* **58**: 378-396.
- Naert G, Rivest S. 2012. CCR2 cells are protective in a tg mouse model of AD, 2011. *Mol Med* **18**: 1.
- 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**: 663-674.
- Nalivaeva NN, Turner AJ. 2013. The amyloid precursor protein: a biochemical enigma in brain development, function and disease. *FEBS Lett* **587**: 2046-54.
- Nasrallah IM, Wolk DA. 2014. Multimodality imaging of Alzheimer disease and other neurodegenerative dementias. *J Nucl Med* **55**: 2003-11.
- Navarro, V. 2015. Caracterización de la respuesta inflamatoria en tejido cerebral postmortem de pacientes de Alzheimer. Tesis Doctoral.
- Nedergaard M. 2013. Neuroscience. Garbage truck of the brain. *Science* **340**: 1529-30. h
- Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, Castellani RJ, Crain BJ, Davies P, Del Tredici K, et al. 2012. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol* **71**: 362-81.).
- Nelson PT, Nelson PT, Braak H, Braak H, Markesbery WR, Markesbery WR. 2009. Neuropathology and cognitive impairment in Alzheimer disease: a complex but coherent relationship. *J Neuropathol Exp Neurol* **68**: 1-14.
- Neumann H, Daly MJ. 2012. Variant TREM2 as Risk Factor for Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* **Volume**: 1-3.
- Nikolaev A, McLaughlin T, O'Leary DDM, Tessier-Lavigne M. 2009. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* **457**: 981-989.
- Nixon R a. 2007. Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J Cell Sci* **120**: 4081-4091.
- Nixon R a, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, Cuervo AM. 2005. Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immunoelectron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol* **64**: 113-122.
- Nixon RA, Yang D-S. 2011. Autophagy failure in Alzheimer's disease--locating the primary defect. *Neurobiol Dis* **43**: 38-45.
- Nó RL de. 1934. Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J für Psychol und Neurol.*
- 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. Tesina de Máster.
- Nyíri G, Stephenson F., Freund T., Somogyi P. 2003. Large variability in synaptic n-methyl-d-aspartate receptor density on interneurons and a comparison with pyramidal-cell spines in the rat hippocampus. *Neuroscience* **119**: 347-363.
- O'Brien RJ, Wong PC. 2011. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci* **34**: 185-204.
- Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM. 2003. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol aging* **24**: 1063-1070.
- Otaegui-Arrazola A, Amiano P, Elbusto A, Urdaneta E, Martínez-Lage P. 2014. Diet, cognition, and Alzheimer's disease: food for thought. *Eur J Nutr* **53**: 1-23.
- Pacheco-Quinto J, Eckman EA. 2013. Endothelin-converting enzymes degrade intracellular β -amyloid produced within the endosomal/lysosomal pathway and autophagosomes. *J Biol Chem* **288**: 5606-15.
- Palop JJ, Mucke L. 2010. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat Neurosci* **13**: 812-818.
- Patel YC. 1999. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol* **20**: 157-98.
- Paxinos G, Franklin KBJ. 2013. The mouse brain in stereotaxic coordinates. *Acad Press* **2nd**.
- Paz Gavilán M, Vela J, Castaño A, Ramos B, del Río JC, Vitorica J, Ruano D. 2006. Cellular environment facilitates protein accumulation in aged rat hippocampus. *Neurobiol Aging* **27**: 973-82.

- Pendlebury ST. 2012. Dementia in patients hospitalized with stroke: rates, time course, and clinico-pathologic factors. *Int J Stroke* **7**: 570-81.
- Pendlebury ST, Rothwell PM. 2009. Prevalence, incidence, and factors associated with pre-stroke and post-stroke dementia: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* **8**: 1006-18.
- Per Andersen, Richard Morris, David Amaral, Tim Bliss JO. 2007. *The Hippocampus Book*. Oxford University Press
- Pera M, Alcolea D, Sánchez-Valle R, Guardia-Laguarta C, Colom-Cadena M, Badiola N, Suárez-Calvet M, Lladó A, Barrera-Ocampo A a., Sepulveda-Falla D, et al. 2013. Distinct patterns of APP processing in the CNS in autosomal-dominant and sporadic Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* **125**: 201-213.
- 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, et al. 2013. Dissecting phenotypic traits linked to human resilience to Alzheimer's pathology. *Brain* **136**: 2510-2526.
- Perl DP. 2010. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med* **77**: 32-42.
- Perry VH, Nicoll J a R, Holmes C. 2010. Microglia in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* **6**: 193-201.
- Philipson O, Lord A, Gumucio A, O'Callaghan P, Lannfelt L, Nilsson LNG. 2010. Animal models of amyloid-beta-related pathologies in Alzheimer's disease. *FEBS J* **277**: 1389-1409.
- Phillips EC, Croft CL, Kurbatskaya K, O'Neill MJ, Hutton ML, Hanger DP, Garwood CJ, Noble W. 2014. Astrocytes and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans* **42**: 1321-1325.
- Pitkänen a, Pikkarainen M, Nurminen N, Ylinen a. 2000. Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann N Y Acad Sci* **911**: 369-391.
- Polydoro M, de Calignon A, Suárez-Calvet M, Sanchez L, Kay KR, Nicholls SB, Roe AD, Pitstick R, Carlson GA, Gómez-Isla T, et al. 2013. Reversal of neurofibrillary tangles and tau-associated phenotype in the rTgTauEC model of early Alzheimer's disease. *J Neurosci* **33**: 13300-11.
- 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.
- 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**: 63-75.e2.
- Rajendran L, Annaert W. 2012. Membrane Trafficking Pathways in Alzheimer's Disease. *Traffic* **13**: 759-770.
- Ramos B, Baglietto-Vargas D, Rio JC Del, Moreno-Gonzalez I, Santa-Maria C, Jimenez S, Caballero C, Lopez-Tellez JF, Khan ZU, Ruano D, et al. 2006. Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1/APP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **27**: 1658-1672.
- Ransohoff RM, Cardona AE. 2010. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature* **468**: 253-262.
- Recalcati S, Locati M. 2010. Differential regulation of iron homeostasis during human macrophage polarized activation. *Eur J*
- Regan C, Katona C, Walker Z, Hooper J, Donovan J, Livingston G. 2006. Relationship of vascular risk to the progression of Alzheimer disease. *Neurology* **67**: 1357-62.
- Reiman EM, Caselli RJ. 1999. Alzheimer's disease. *Maturitas* **31**: 185-200.
- Reinikainen KJ, Riekkinen PJ, Jolkkonen J, Kosma V-M, Soininen H. 1987. Decreased somatostatin-like immunoreactivity in cerebral cortex and cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Brain Res* **402**: 103-108.
- Reitz C, Brayne C, Mayeux R. 2011. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* **7**: 137-52.
- Richard Armstrong. 2006. Plaques and tangles and the pathogenesis of Alzheimer ' s disease. *Folia Neuropathol* **44**: 1-11.
- Riekkinen PJ, Pitkänen A. 1990. Somatostatin and epilepsy. *Metabolism* **39**: 112-5.
- Rijal Upadhaya A, Kosterin I, Kumar S, von Arnim CAF, Yamaguchi H, Fändrich M, Walter J, Thal DR. 2014. Biochemical stages of amyloid- β peptide aggregation

- and accumulation in the human brain and their association with symptomatic and pathologically preclinical Alzheimer's disease. *Brain* **137**: 887-903.
- Ringman JM, Liang L-J, Zhou Y, Vangala S, Teng E, Kremen S, Wharton D, Goate A, Marcus DS, Farlow M, et al. 2015. Early behavioural changes in familial Alzheimer's disease in the Dominantly Inherited Alzheimer Network. *Brain* **138**: 1036-45.
- Rinne JO, Brooks DJ, Rossor MN, Fox NC, Bullock R, Klunk WE, Mathis CA, Blennow K, Barakos J, Okello AA, et al. 2010. 11C-PiB PET assessment of change in fibrillar amyloid-beta load in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: a phase 2, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose study. *Lancet Neurol* **9**: 363-72.
- Robbins RJ, Brines ML, Kim JH, Adrian T, de Lanerolle N, Welsh S, Spencer DD. 1991. A selective loss of somatostatin in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* **29**: 325-32.
- Rodríguez JJ, Noristani HN, Hilditch T, Olabarria M, Yeh CY, Witton J, Verkhratsky A. 2013. Increased densities of resting and activated microglia in the dentate gyrus follow senile plaque formation in the CA1 subfield of the hippocampus in the triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **552**: 129-34.
- Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T. 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**: 775-8..
- Rogaeva E, Meng Y, Lee JH, Gu Y, Kawarai T, Zou F, Katayama T, Baldwin CT, Cheng R, Hasegawa H, et al. 2007. The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet* **39**: 168-77.
- Rogers J, Strohmeier R, Kovelowski CJ, Li R. 2002. Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. *Glia* **40**: 260-9.
- Ruan L, Kang Z, Pei G, Le Y. 2009. Amyloid Deposition and Inflammation in APPswe / PS1dE9 Mouse Model of Alzheimer's Disease. 531-540.
- Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM. 2012. A Review: Inflammatory Process in Alzheimer's Disease, Role of Cytokines. *Sci World J* **2012**: 1-15.
- Rutten BPF, Van der Kolk NM, Schafer S, van Zandvoort MAMJ, Bayer TA, Steinbusch HWM, 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**: 161-73.
- Saito T, Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Takano J, Huang S-M, Suemoto T, Higuchi M, Saido TC. 2005. Somatostatin regulates brain amyloid beta peptide Abeta42 through modulation of proteolytic degradation. *Nat Med* **11**: 434-439.
- Sakono M, Zako T. 2010. Amyloid oligomers: Formation and toxicity of Abeta oligomers. *FEBS J* **277**: 1348-1358.
- 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.
- 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, et al. 2012. Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer's mice hippocampus. *Acta Neuropathol* **123**: 53-70.
- Sánchez-Varo, R. 2011. Estudio de la neuropatología neurítica y sináptica en el hipocampo del modelo transgénico murino PS1/APP de la enfermedad de Alzheimer. Tesis Doctoral.
- SantaCruz KS, Sonnen JA, Pezhohou MK, Desrosiers MF, Nelson PT, Tyas SL. 2011. Alzheimer disease pathology in subjects without dementia in 2 studies of aging: the Nun Study and the Adult Changes in Thought Study. *J Neuropathol Exp Neurol* **70**: 832-40.
- Sarsoza F, Saing T, Kaye R, Dahlin R, Dick M, Broadwater-Hollifield C, Mobley S, Lott I, Doran E, Gillen D, et al. 2009. A fibril-specific, conformation-dependent antibody recognizes a subset of Aβ plaques in Alzheimer disease, Down syndrome and Tg2576 transgenic mouse brain. *Acta Neuropathol* **118**: 505-517.
- Savva GM, Stephan BCM. 2010. Epidemiological studies of the effect of stroke on incident dementia: a systematic review. *Stroke* **41**: e41-6.
- Scarmeas N, Luchsinger JA, Schupf N, Brickman AM, Cosentino S, Tang MX, Stern Y. 2009. Physical activity,

- diet, and risk of Alzheimer disease. *JAMA* **302**: 627-37.
- Schäfer MK-H, Eiden L., Weihe E. 1998. Cholinergic neurons and terminal fields revealed by immunohistochemistry for the vesicular acetylcholine transporter. I. Central nervous system. *Neuroscience* **84**: 331-359.
- Schmitz C, Rutten BP, Pielen a, Schafer S, Wirths O, Tremp G, Czech C, Blanchard V, Multhaup G, Rezaie P, et al. 2004. Hippocampal neuron loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **164**: 1495-1502.
- Schneider JA, Arvanitakis Z, Leurgans SE, Bennett DA. 2009. The neuropathology of probable Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Ann Neurol* **66**: 200-8.
- Selkoe DJ. 2001. Alzheimer ' s Disease : Genes , Proteins , and Therapy. *Perspective* **81**: 741-767.
- Selkoe DJ. 2008. Biochemistry and molecular biology of amyloid beta-protein and the mechanism of Alzheimer's disease. *Handb Clin Neurol* **89**: 245-60.
- Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. 2011. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **1**.
- Serrano-Pozo A, Gómez-Isla T, Growdon JH, Frosch MP, Hyman BT. 2013a. A phenotypic change but not proliferation underlies glial responses in Alzheimer disease. *Am J Pathol* **182**: 2332-2344.
- Serrano-Pozo A, Mielke ML, Muzitansky A, Gómez-Isla T, Growdon JH, Bacskai BJ, Betensky R a., Frosch MP, Hyman BT. 2012. Stable Size Distribution of Amyloid Plaques Over the Course of Alzheimer Disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **71**: 694-701.
- Serrano-Pozo A, Muzikansky A, Gómez-Isla T, Growdon JH, Betensky R a, Frosch MP, Hyman BT. 2013b. Differential relationships of reactive astrocytes and microglia to fibrillar amyloid deposits in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **72**: 462-71.
- Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL. 2007. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci* **27**: 2866-75.
- Shankar GM, Walsh DM. 2009. Alzheimer's disease: synaptic dysfunction and Abeta. *Mol Neurodegener* **4**: 48.
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, et al. 1995. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* **375**: 754-60.
- Sidoryk-Wegrzynowicz M, Wegrzynowicz M, Lee E, Bowman AB, Aschner M. 2011. Role of astrocytes in brain function and disease. *Toxicol Pathol* **39**: 115-23.
- Simón D, García-García E. 2012. Tau overexpression results in its secretion via membrane vesicles. *Neurodegener*
- Sofroniew M V., Vinters H V. 2010. Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathol* **119**: 7-35.
- Solodkin a, Veldhuizen SD, Van Hoesen GW. 1996. Contingent vulnerability of entorhinal parvalbumin-containing neurons in Alzheimer's disease. *J Neurosci* **16**: 3311-3321.
- Soucek T, Cumming R, Dargusch R, Maher P, Schubert D. 2003. The Regulation of Glucose Metabolism by HIF-1 Mediates a Neuroprotective Response to Amyloid Beta Peptide. *Neuron* **39**: 43-56.
- Spires-Jones TL, Hyman B. 2014. The Intersection of Amyloid Beta and Tau at Synapses in Alzheimer's Disease. *Neuron* **82**: 756-771. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.05.004>.
- Spires-Jones TL, Stoothoff WH, de Calignon A, Jones PB, Hyman BT. 2009. Tau pathophysiology in neurodegeneration: a tangled issue. *Trends Neurosci* **32**: 150-9.
- Squire LR. 2004. Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* **82**: 171-177.
- Stokin GB. 2005. Axonopathy and Transport Deficits Early in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Science* (80-) **307**: 1282-1288. <http://www.sciencemag.org/content/307/5713/1282.abstract> (Accedido abril 16, 2015).
- Streit WJ. 2004. Microglia and Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci Res* **77**: 1-8.

- Streit WJ. 2006. Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date? *Trends Neurosci* **29**: 506-510.
- Streit WJ, Sammons NW, Kuhns AJ, Sparks DL. 2004. Dystrophic Microglia in the Aging Human Brain. *Glia* **45**: 208-212.
- Streit WJ, Xue QS, Braak H, del Tredici K. 2014a. Presence of severe neuroinflammation does not intensify neurofibrillary degeneration in human brain. *Glia* **62**: 96-105.
- Streit WJ, Xue Q-S, Tischer J, Bechmann I. 2014b. Microglial pathology. *Acta Neuropathol Commun* **2**: 142.
- Su JH, Cummings BJ, Cotman CW. 1993. Identification and distribution of axonal dystrophic neurites in Alzheimer's disease. *Brain Res* **625**: 228-237.
- Su Y, Ni B. 1998. Selective deposition of amyloid-beta protein in the entorhinal-dentate projection of a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* **53**: 177-86.
- Suh Y, Checler F. 2002. Amyloid Precursor Protein, Presenilins, and α -Synuclein: Molecular Pathogenesis and Pharmacological Applications in Alzheimer's Disease. *Pharmacol Rev* **54**: 469-525.
- Suzuki W a. 1996. The anatomy, physiology and functions of the perirhinal cortex. *Curr Opin Neurobiol* **6**: 179-186.
- Suzuki W a., Amaral DG. 2003. Where are the perirhinal and parahippocampal cortices? A historical overview of the nomenclature and boundaries applied to the primate medial temporal lobe. *Neuroscience* **120**: 893-906.
- Suzuki W a., Naya Y. 2014. The Perirhinal Cortex. *Annu Rev Neurosci* **37**: 39-53.
- Tabas I. 2010. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol* **10**: 36-46.
- Tai H-C, Serrano-Pozo A, Hashimoto T, Frosch MP, Spirese Jones TL, Hyman BT. 2012. The synaptic accumulation of hyperphosphorylated tau oligomers in Alzheimer disease is associated with dysfunction of the ubiquitin-proteasome system. *Am J Pathol* **181**: 1426-35.
- 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**: 145-60.
- Takashima A. 2013. Tauopathies and tau oligomers. *J Alzheimer's Dis* **37**: 565-568.
- Tan J, Town T, Crawford F, Mori T, DelleDonne A, Crescentini R, Obregon D, Flavell RA, Mullan MJ. 2002. Role of CD40 ligand in amyloidosis in transgenic Alzheimer's mice. *Nat Neurosci* **5**: 1288-93.
- Tang Y, Le W. 2015. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*.
- Tarasoff-Conway JM, Carare RO, Osorio RS, Glodzik L, Butler T, Fieremans E, Axel L, Rusinek H, Nicholson C, Zlokovic B V, et al. 2015. Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* **11**: 457-470.
- Terry R, Masliah E, Salmon D. 1991. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann ...*
- Thal DR, Capetillo-Zarate E, Del Tredici K, Braak H. 2006. The development of amyloid beta protein deposits in the aged brain. *Sci Aging Knowledge Environ* **2006**: re1.
- Thal DR, Griffin WST, Braak H. 2008. Parenchymal and vascular A β -deposition and its effects on the degeneration of neurons and cognition in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med* **12**: 1848-1862.
- Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H. 2002. Phases of A β -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* **58**: 1791-800.
- Thal DR, Walter J, Saido TC, Fändrich M. 2014. Neuropathology and biochemistry of A β and its aggregates in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **129**: 167-182.
- The Alzheimer's Disease Anti-inflammatory prevention Trial Research Group. 2013. Results of a follow-up study to the randomized Alzheimer's Disease Anti-inflammatory Prevention Trial (ADAPT). *Alzheimers Dement* **9**: 714-23.

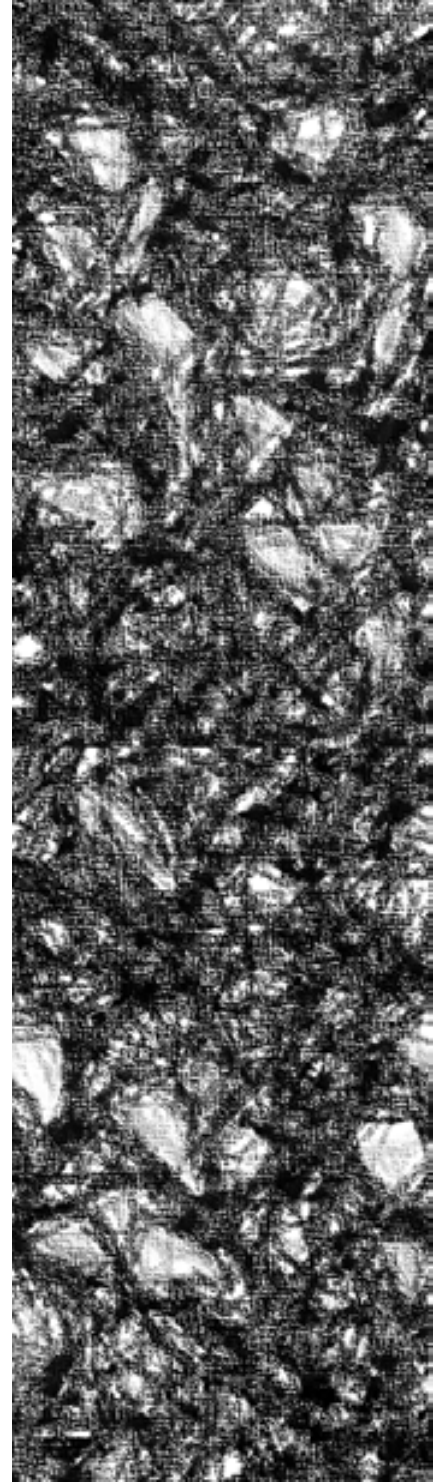
- Thompson PM, Hayashi KM, de Zubicaray G, Janke AL, Rose SE, Semple J, Herman D, Hong MS, Dittmer SS, Doddrell DM, et al. 2003. Dynamics of Gray Matter Loss in Alzheimer's Disease. *J Neurosci* **23**: 994-1005.
- Tomic JL, Pensalfini A, Head E, Glabe CG. 2009. Soluble fibrillar oligomer levels are elevated in Alzheimer's disease brain and correlate with cognitive dysfunction. *Neurobiol Dis* **35**: 352-8.
- Torres M, Jimenez S, Sanchez-Varo R, Navarro V, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Carmona I, Davila JC, Vizuete M, Gutierrez A, et al. 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.
- Townsend M, Mehta T, Selkoe DJ. 2007. Soluble Abeta inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway. *J Biol Chem* **282**: 33305-12.
- 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**: 521-541.
- 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, et al. 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.
- Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC. 2003. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol* **70**: 1-32.
- Turner RS. 2001. Alzheimer's disease in man and transgenic mice: females at higher risk. *Am J Pathol* **158**: 797-801.
- V Eitzen U, Egensperger R, Kösel S, Grasbon-Frodl EM, Imai Y, Bise K, Kohsaka S, Mehraein P, Graeber MB. 1998. Microglia and the development of spongiform change in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **57**: 246-56.
- Van Dam D, De Deyn PP. 2011. Animal models in the drug discovery pipeline for Alzheimer's disease. *Br J Pharmacol* **164**: 1285-1300.
- Van Groen T, Kadish I, Wyss JM. 2002. Species differences in the projections from the entorhinal cortex to the hippocampus. *Brain Res Bull* **57**: 553-556.
- Van Norden AGW, van Dijk EJ, de Laat KF, Scheltens P, Olderikkert MGM, de Leeuw FE. 2012. Dementia: Alzheimer pathology and vascular factors: from mutually exclusive to interaction. *Biochim Biophys Acta* **1822**: 340-9.
- Van Strien NM, Cappaert NLM, Witter MP. 2009. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci* **10**: 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 (Warsz)* **60**: 251-66.
- Varvel NH, Grathwohl S a., Baumann F, Liebig C, Bosch a., Brawek B, Thal DR, Charo IF, Heppner FL, Aguzzi a., et al. 2012. Microglial repopulation model reveals a robust homeostatic process for replacing CNS myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 18150-18155.
- Verkhatsky A, Parpura V, Pekna M, Pekny M, Sofroniew M. 2014. Glia in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans* **42**: 1291-1301.
- Vetrivel K, Zhang Y. 2006. Pathological and physiological functions of presenilins. *Mol Neurodegener*.
- Villarreal AE, Barron R, Rao KS, Britton GB. 2014. The effects of impaired cerebral circulation on Alzheimer's disease pathology: evidence from animal studies. *J Alzheimers Dis* **42**: 707-22.
- Viola KL, Klein WL. 2015. Amyloid β oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathol* **129**: 183-206.
- Viollet C, Lepousez G, Loudes C, Videau C, Simon A, Epelbaum J. 2008. Somatostatinergic systems in brain: Networks and functions. *Mol Cell Endocrinol* **286**: 75-87.

- Volianskis A, Køstner R, Mølgaard M, Hass S, Jensen MS. 2010. Episodic memory deficits are not related to altered glutamatergic synaptic transmission and plasticity in the CA1 hippocampus of the APP^{sw}/PS1^{ΔE9}-deleted transgenic mice model of β -amyloidosis. *Neurobiol Aging* **31**: 1173-87.).
- Walker DG, Lue L-F. 2015. Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: challenges to detecting microglial polarization in human brains. *Alzheimers Res Ther* **7**: 56.
- Walsh DM, Lomakin A, Benedek GB, Condron MM, Teplow DB. 1997. Amyloid β -Protein Fibrillogenesis: DETECTION OF A PROTOFIBRILLAR INTERMEDIATE. *J Biol Chem* **272**: 22364-22372.
- Wang AY, Lohmann KM, Yang CK, Zimmerman EI, Pantazopoulos H, Herring N, Berretta S, Heckers S, Konradi C. 2011. Bipolar disorder type 1 and schizophrenia are accompanied by decreased density of parvalbumin- and somatostatin-positive interneurons in the parahippocampal region. *Acta Neuropathol* **122**: 615-626.
- Wang Y, Martinez-Vicente M, Krüger U, Kaushik S, Wong E, Mandelkow E-M, Cuervo AM, Mandelkow E. 2009. Tau fragmentation, aggregation and clearance: the dual role of lysosomal processing. *Hum Mol Genet* **18**: 4153-70.
- Wang Y, Toledo-Rodriguez M, Gupta A, Wu C, Silberberg G, Luo J, Markram H. 2004. Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat. *J Physiol* **561**: 65-90.
- Watt AD, Perez K a., Rembach A, Sherrat N a., Hung LW, Johanssen T, McLean C a., Kok WM, Hutton C a., Fodero-Tavoletti M, et al. 2013. Oligomers, fact or artefact? SDS-PAGE induces dimerization of β -amyloid in human brain samples. *Acta Neuropathol* **125**: 549-564.
- Webber K, Casadesus G, Bowen R, Perry G, Smith M. 2007. Evidence for the Role of Luteinizing Hormone in Alzheimer Disease. *Endocrine, Metab Immune Disord Targets* **7**: 300-303..
- 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.
- Weller RO, Subash M, Preston SD, Mazanti I, Carare RO. 2008. Perivascular drainage of amyloid- β peptides from the brain and its failure in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *Brain Pathol* **18**: 253-266.
- West MJ, Kawas CH, Stewart WF, Rudow GL, Troncoso JC. 2004. Hippocampal neurons in pre-clinical Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **25**: 1205-12.
- Wharton SB, Brayne C, Savva GM, Matthews FE, Forster G, Simpson J, Lacey G, Ince PG. 2011. Epidemiological neuropathology: the MRC Cognitive Function and Aging Study experience. *J Alzheimers Dis* **25**: 359-72.
- 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**: 122-6.
- Witter MP, Amaral DG. 2004. Hippocampal Formation. *Rat Nerv Syst* 635-704.
- Witter MP, Wouterlood FG, Naber P a, Van Haeften T. 2000. Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network. *Ann N Y Acad Sci* **911**: 1-24.
- Wonders C, Anderson S a. 2005. Cortical interneurons and their origins. *Neuroscientist* **11**: 199-205.
- Woodruff-pak DS. 2008. Animal Models of Alzheimer ' s Disease : Therapeutic Implications. *J Alzheimer's Dis* **15**: 507-521.
- Xue QS, Streit WJ. 2011. Microglial pathology in Down syndrome. *Acta Neuropathol* **122**: 455-466.
- Yamamoto N, Matsubara E, Maeda S, Minagawa H, Takashima A, Maruyama W, Michikawa M, Yanagisawa K. 2007. A ganglioside-induced toxic soluble A β assembly. Its enhanced formation from A β bearing the Arctic mutation. *J Biol Chem* **282**: 2646-55
- Yanamandra K, Kfoury N, Jiang H, Mahan TE, Ma S, Maloney SE, Wozniak DF, Diamond MI, Holtzman DM. 2013. Anti-tau antibodies that block tau aggregate seeding in vitro markedly decrease pathology and improve cognition in vivo. *Neuron* **80**: 402-14.
- Yang T, Hong S, O'Malley T, Sperling RA, Walsh DM, Selkoe DJ. 2013. New ELISAs with high specificity for soluble oligomers of amyloid β -protein detect natural

Bibliografía

- A β oligomers in human brain but not CSF. *Alzheimers Dement* **9**: 99-112.
- Zempel H, Luedtke J, Kumar Y, Biernat J, Dawson H, Mandelkow E, Mandelkow E-M. 2013. Amyloid- β oligomers induce synaptic damage via Tau-dependent microtubule severing by TLL6 and spastin. *EMBO J* **32**: 2920-37.
- Zhang C-E, Yang X, Li L, Sui X, Tian Q, Wei W, Wang J, Liu G. 2014. Hypoxia-induced tau phosphorylation and memory deficit in rats. *Neurodegener Dis* **14**: 107-16.
- Zhang F, Jiang L. 2015. Neuroinflammation in Alzheimer 's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat* **11**: 243-256.
- Zhang JY, Liu SJ, Li HL, Wang J-Z. 2005. Microtubule-associated protein tau is a substrate of ATP/Mg(2+)-dependent proteasome protease system. *J Neural Transm* **112**: 547-55.
- Zhang X, Le W. 2010. Pathological role of hypoxia in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* **223**: 299-303.
- Zhang X, Zhou K, Wang R, Cui J, Lipton SA, Liao F-F, Xu H, Zhang Y. 2007. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha)-mediated hypoxia increases BACE1 expression and beta-amyloid generation. *J Biol Chem* **282**: 10873-80.
- Zhao W-Q, De Felice FG, Fernandez S, Chen H, Lambert MP, Quon MJ, Krafft GA, Klein WL. 2008. Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. *FASEB J* **22**: 246-60.

8. Anexo



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 β) 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 β 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 β 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 β pathology.

Keywords: Alzheimer's disease, amyloid, entorhinal cortex, microglia, neurodegeneration, neuroinflammation, transgenic

INTRODUCTION

Accumulation of extracellular amyloid- β (A β) 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

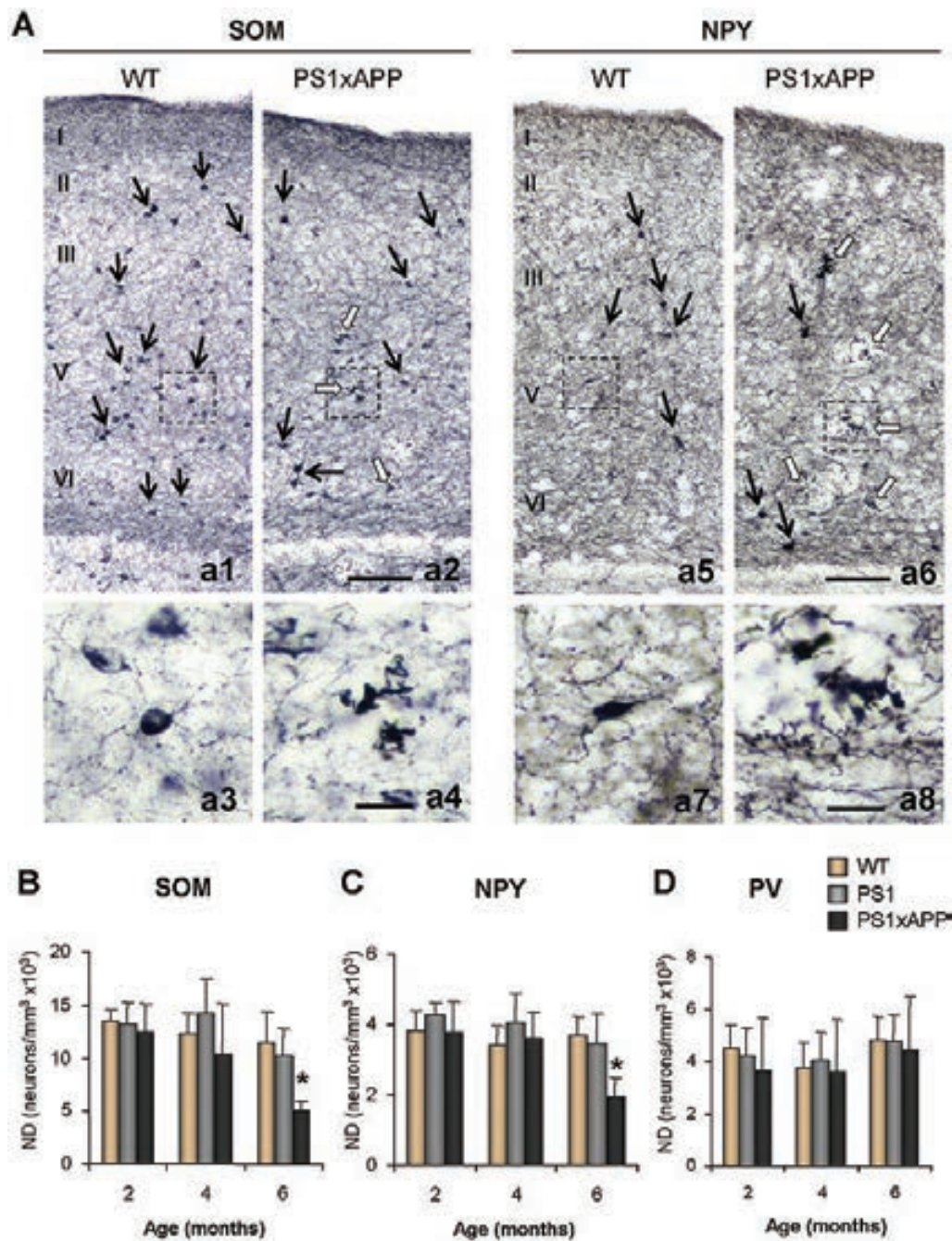


Fig. 1. Selective loss of SOM and NPY cells in the entorhinal cortex of PS1xAPP mice at 6 months of age. **A)** Light microscopic images of SOM (a1-a4) and NPY (a5-a8) immunostaining in entorhinal sections of 6 month-old WT (a1 and a3 for SOM; a5 and a7 for NPY) and PS1xAPP (a2 and a4 for SOM; a6 and 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 ± 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

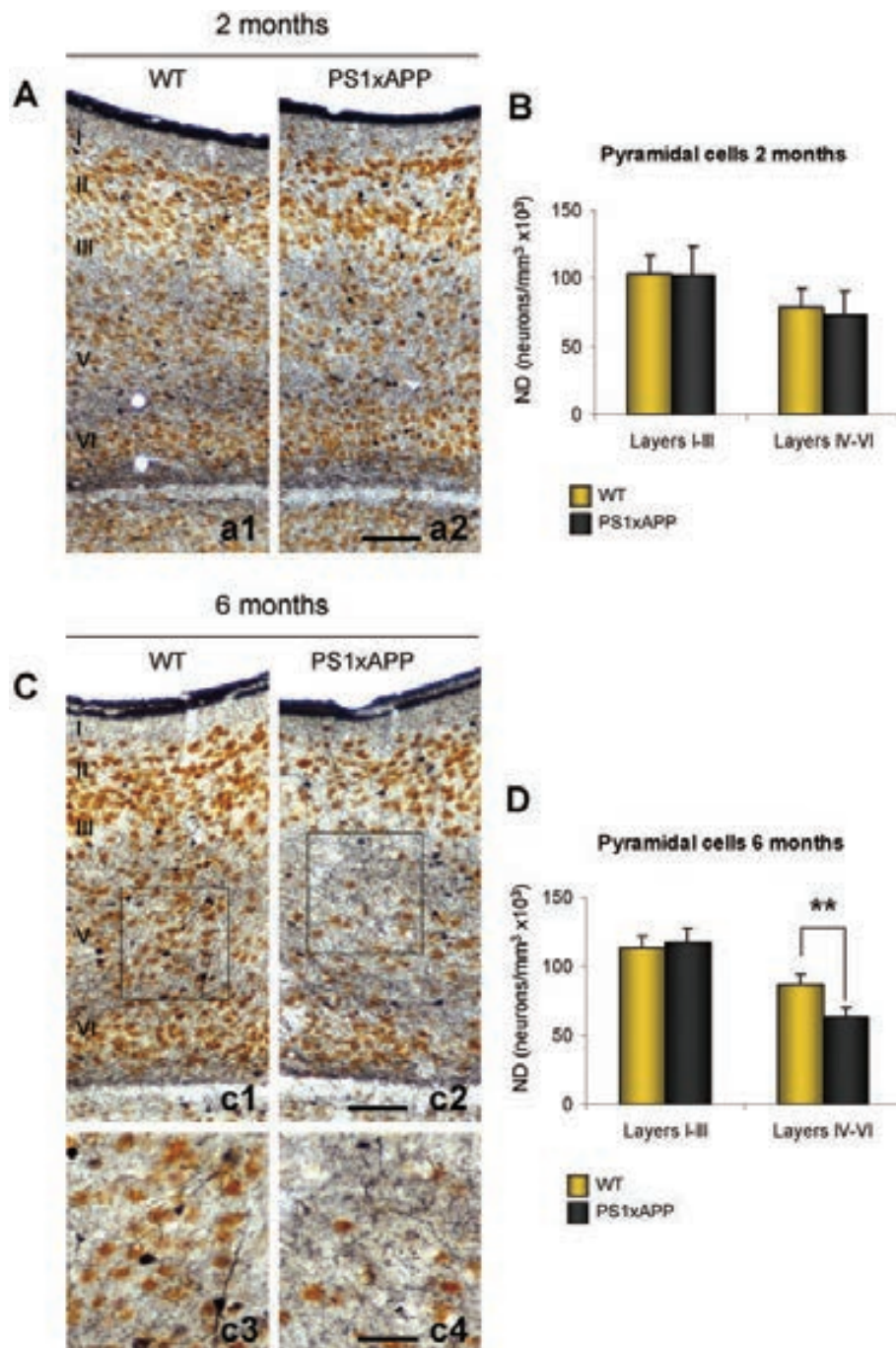


Fig. 2. Selective loss of principal cells in the deep layers of PS1xAPP entorhinal cortex at 6 months of age. Multiple 5x (SOM, PV, CR, VIP, and NeuN)-immunolabeling in the entorhinal cortex of WT and PS1xAPP mice at 2 (A) and 6 months (C) of age. Principal cells (single labeled NeuN cells in brown) 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.

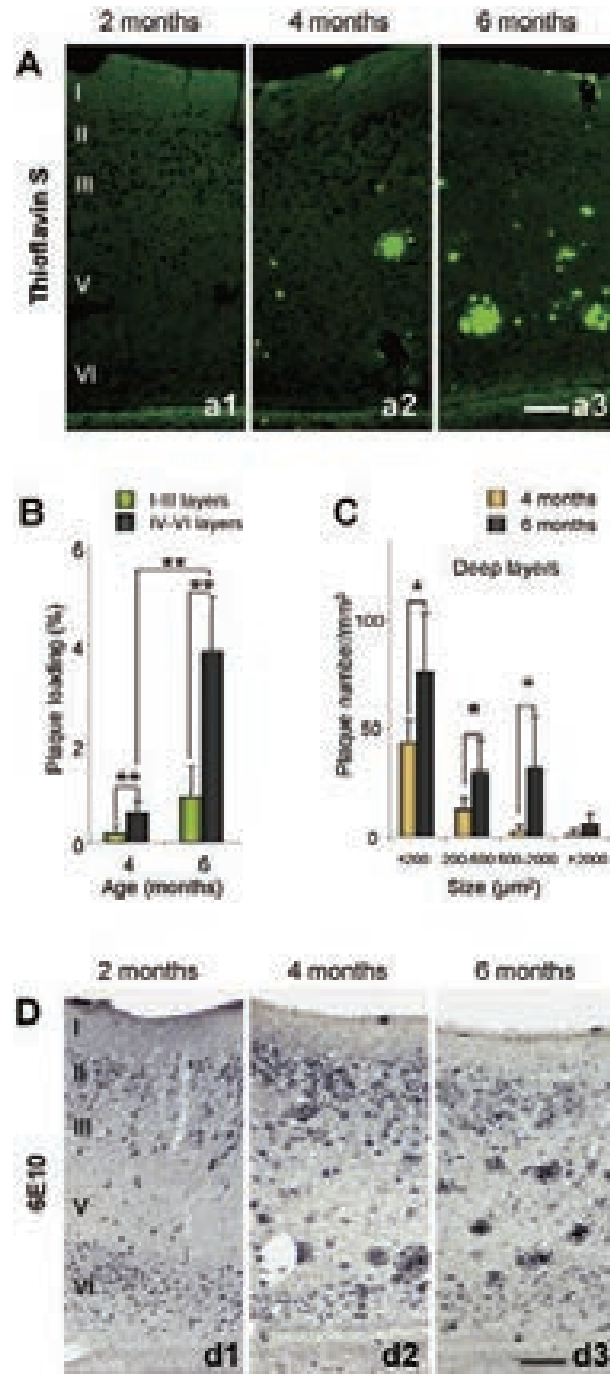


Fig. 3. Extracellular $A\beta$ deposits are preferentially located in deep layers of entorhinal cortex in PS1xAPP mice at early ages. **A)** Thioflavin-S staining in entorhinal cortex of PS1xAPP at 2 (a1), 4 (a2) and 6 (a3) months of age. Amyloid deposits were first seen at 4 months of age. No intracellular 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

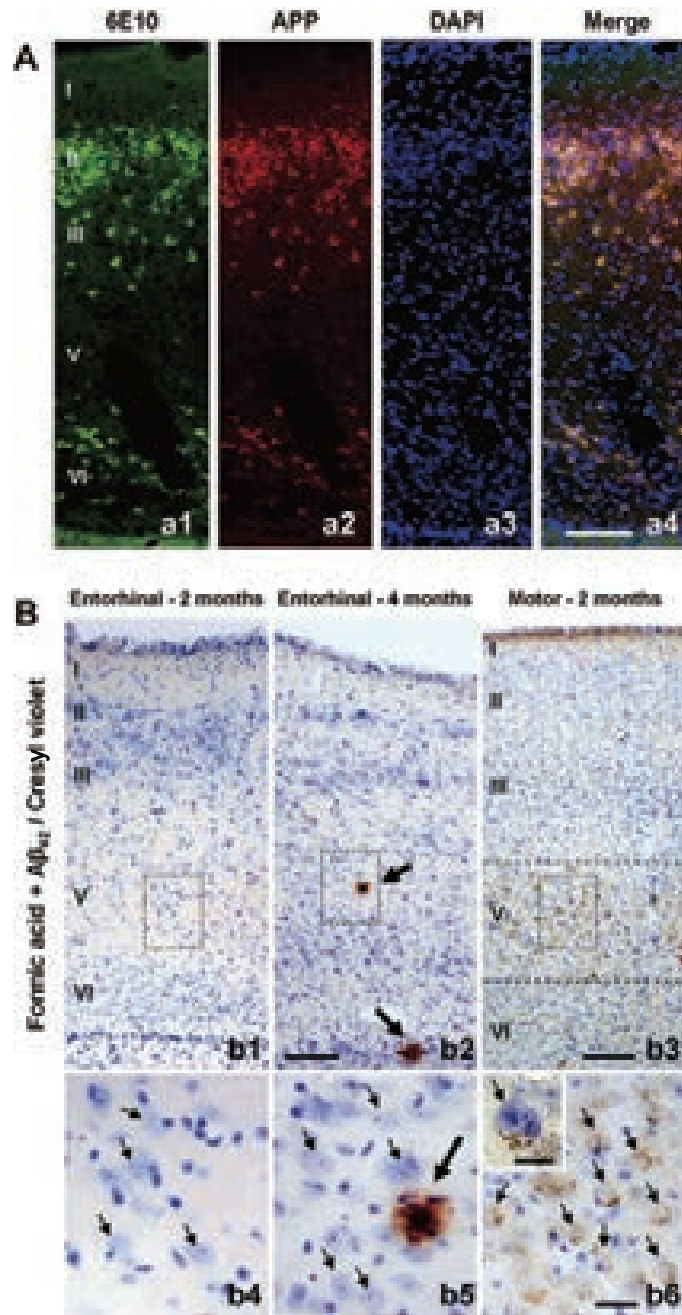


Fig. 4. Entorhinal neurons of PS1xAPP mice do not accumulate intracellular $A\beta$ at early ages. **A**) Double 6E10(a1)/hA β PP(a2) immunofluorescence labeling, together with nuclear DAPI (a3) counterstaining, in 2 month-old PS1xAPP entorhinal cortex. Merged image (a4) shows coincidence of 6E10 and 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.

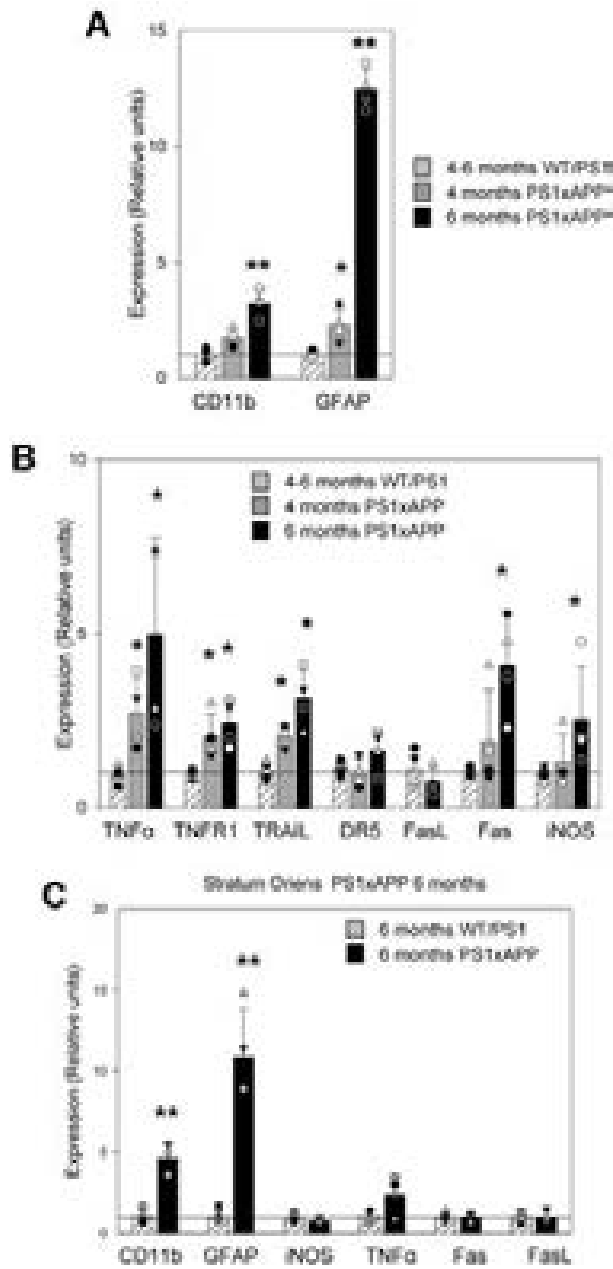
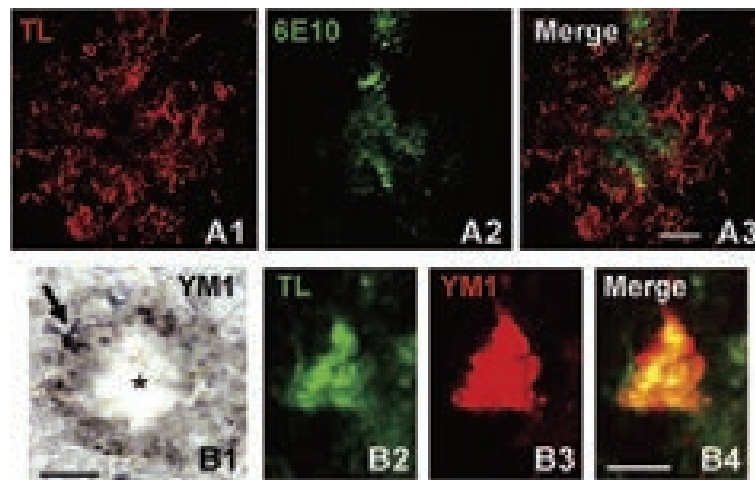


Fig. 5. Early glial activation displays a cytotoxic profile in the entorhinal cortex and a non-cytotoxic profile in the hippocampal stratum oriens of PS1xAPP mice. The mRNA expression of several inflammatory markers was determined by qPCR in microdissected samples of entorhinal cortex (A and B) and hippocampal 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

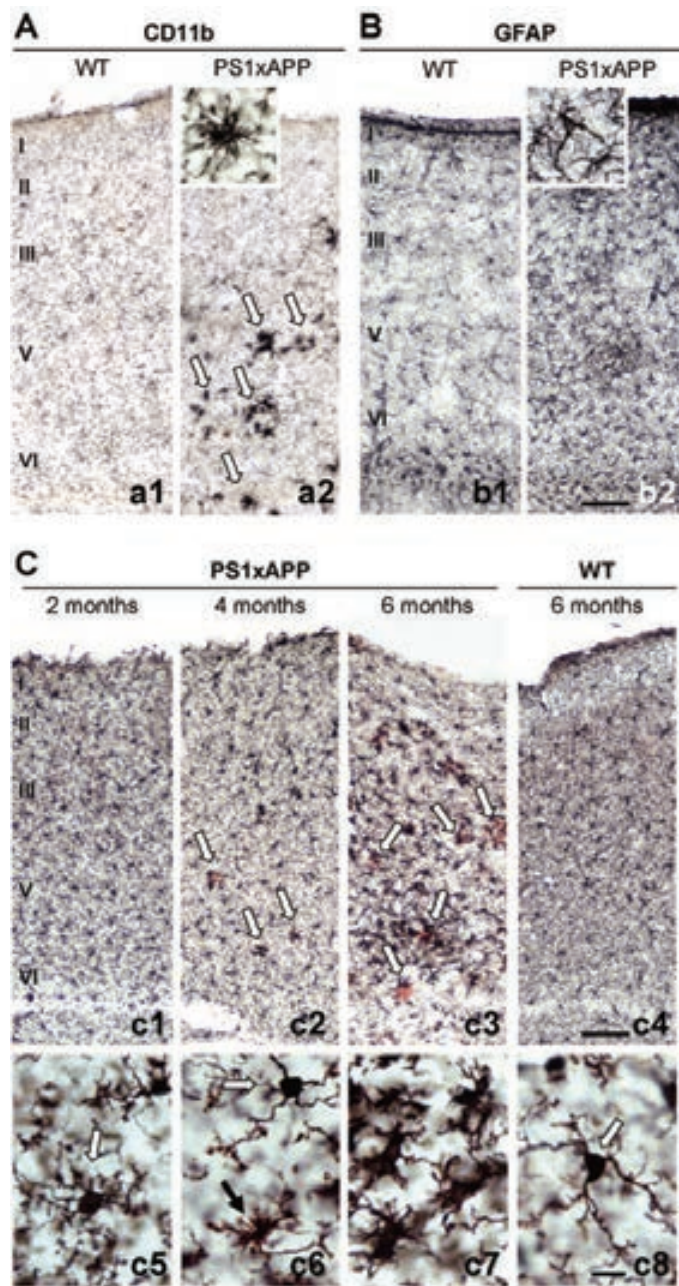


Fig. 6. Cellular expression of microglial (CD11b and Iba-1) and astroglial (GFAP) markers in the entorhinal cortex of young PS1xAPP mice. **A**) CD11b immunostaining shows resting microglial cells distributed throughout cortical laminae in WT mice (a1) and the presence of activated microglial cells, surrounding A β 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 β 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 β 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 μ m; Insets a2 and b2, 10 μ m; c5-c8, 10 μ m.

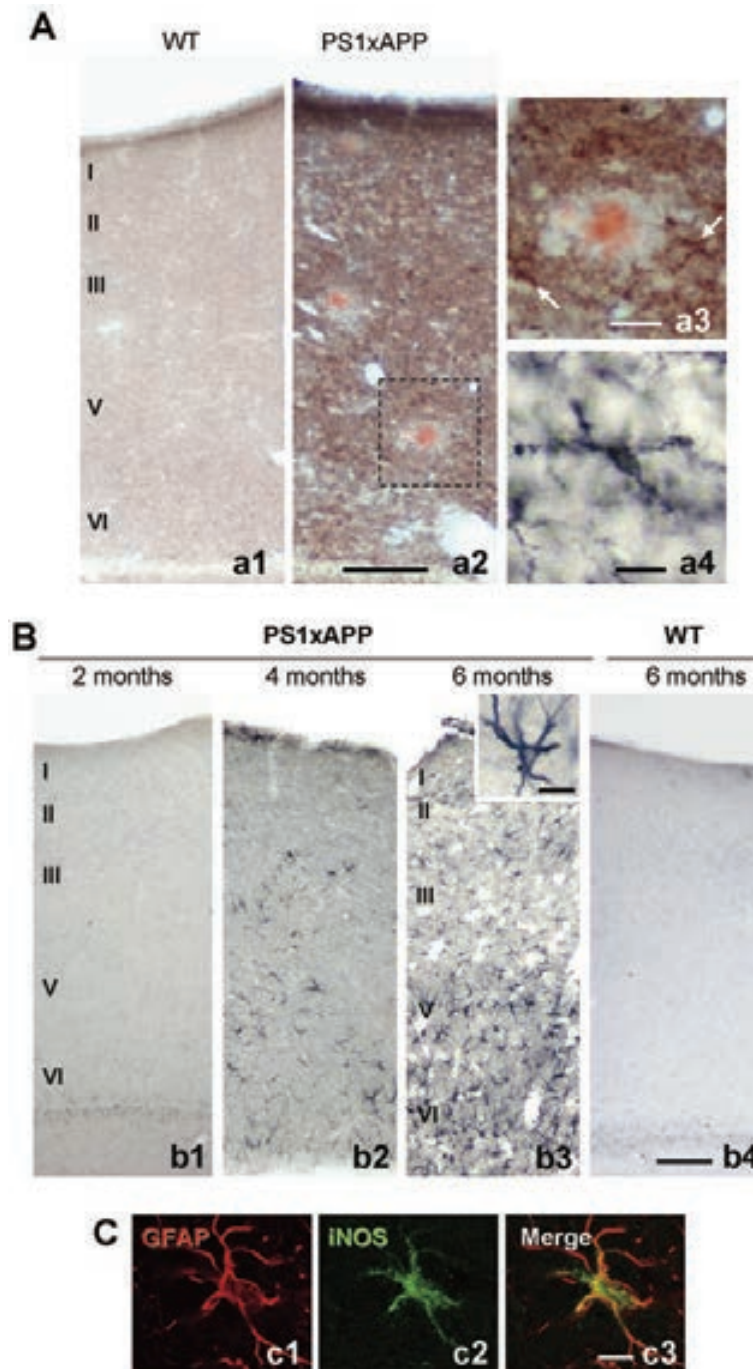


Fig. 7. Cellular immunolocalization of $\text{TNF}\alpha$ and iNOS in the entorhinal cortex of 6 month-old PS1xAPP mice. **A**) Strong $\text{TNF}\alpha$ immunoreactivity was observed widespread in all layers of the entorhinal cortex of PS1xAPP (a2) except in the periphery of Congo red stained $\text{A}\beta$ 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-

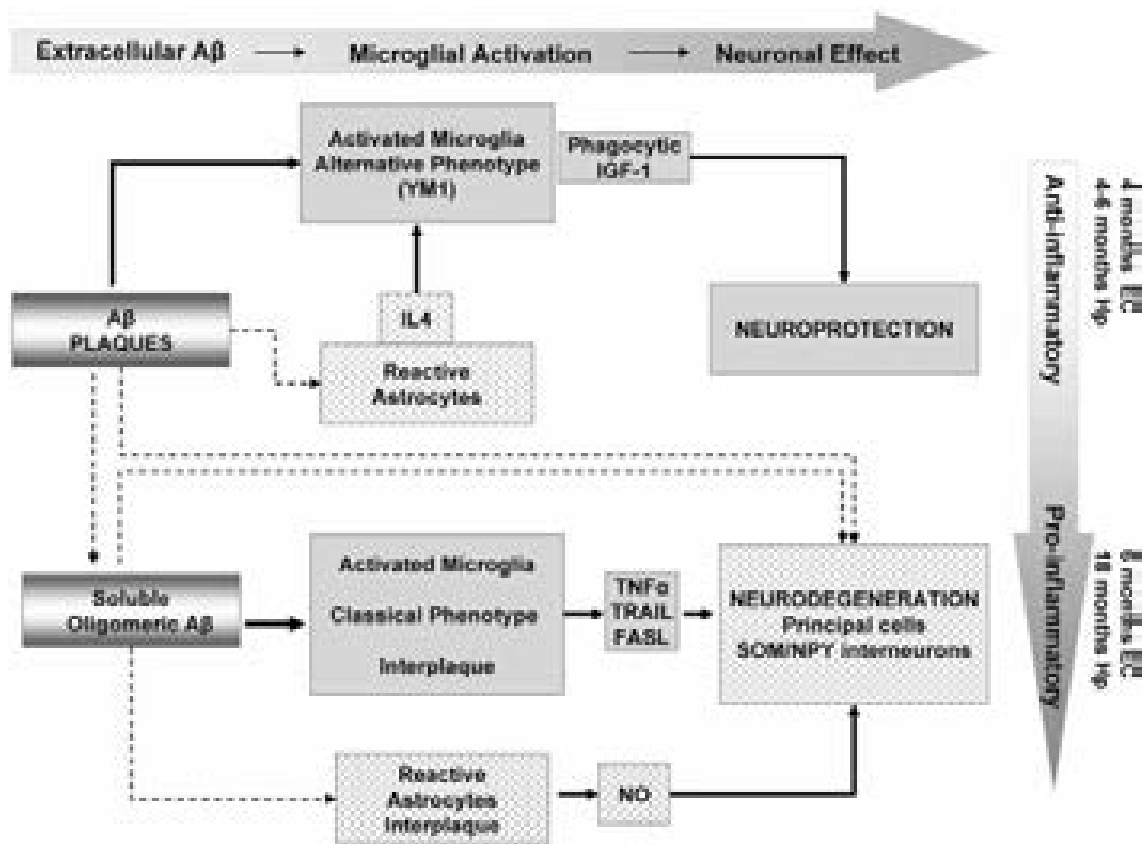


Fig. 8. Schematic representation of the microglial activation by A β and its age-dependent neuroprotective or neurodegenerative effect in PS1xAPP entorhinal cortex and hippocampus. At 4 months of age in both regions, A β deposits promote microglial activation to an alternative phenotype (YM1-positive) that shows phagocytic capability and expression of IGF1. At the same time, reactive astrocytes, recruited by A β , release IL-4 that induces differentiation of microglial cells to an alternative stage. This alternative microglia, only surround A β 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 β (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 β plaques might be a source of soluble oligomeric A β . 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 β species implicated in the microglial activation. However, soluble A β oligomers are reported to be the preferential toxic amyloid species [62–64]. Amyloid plaques are potentially major sources of soluble and toxic oligomeric A β [65]. Furthermore, we have recently reported microglial activation due to oligomeric A β [14]. Thus, the preferential accumulation of A β

plaques in deep layers (this study), that agrees with the entorhinal connectivity and the synaptic release of A β , might also locally increase the concentration A β 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 β 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, Lambolze 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.

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 Yébenes

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

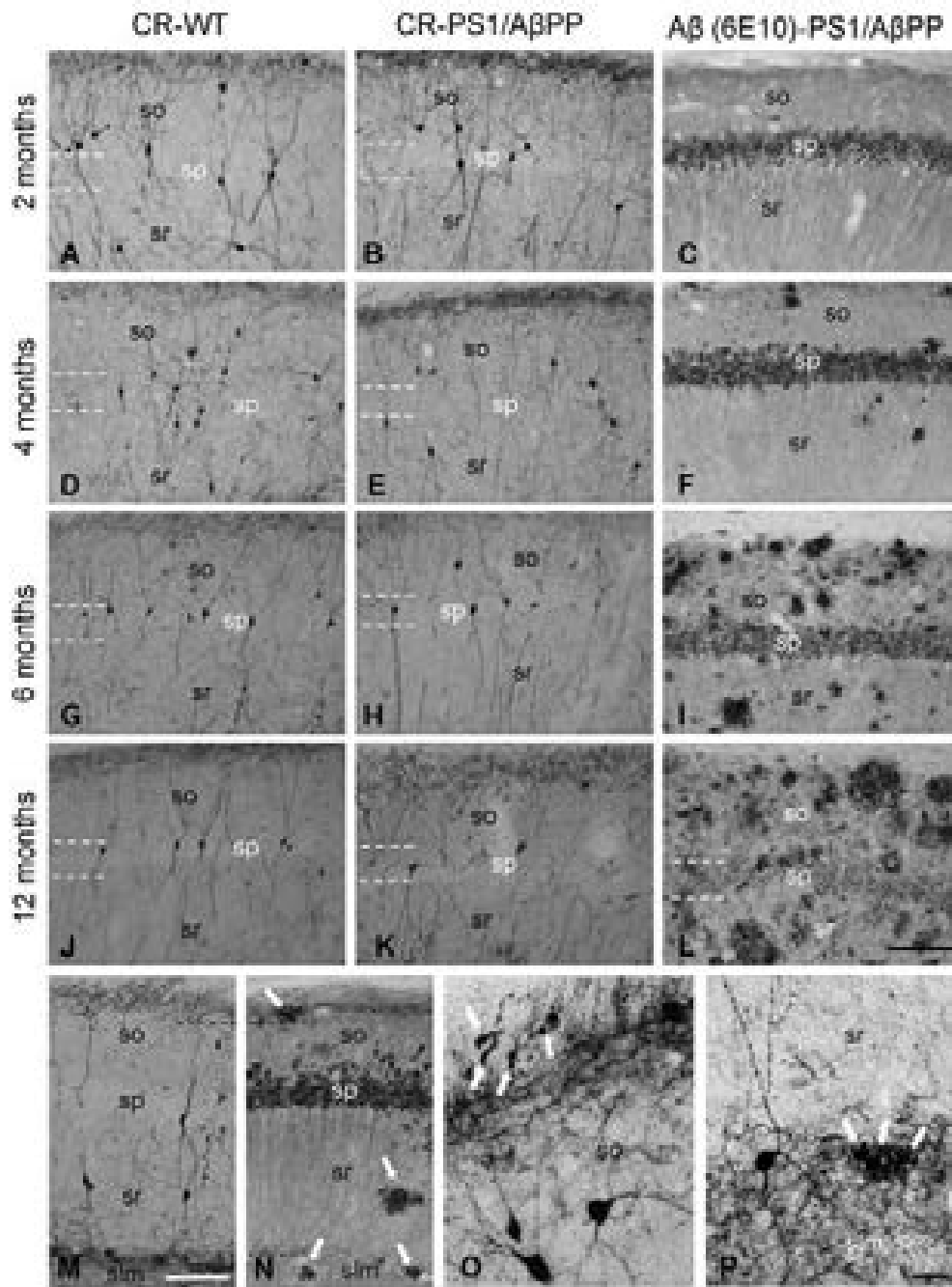


Fig. 1. CR-immunoreactive interneurons in hippocampal CA1 subfield. Light microscopic images of CR immunoreactivity in CA1 subfield of WT (A-D-G-J) and PS1/A β PP (B-E-H-K) mice at 2, 4, 6, and 12 months of age. CR-cells are located in all layers. These cells have smooth or beaded radially oriented dendrites. 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).

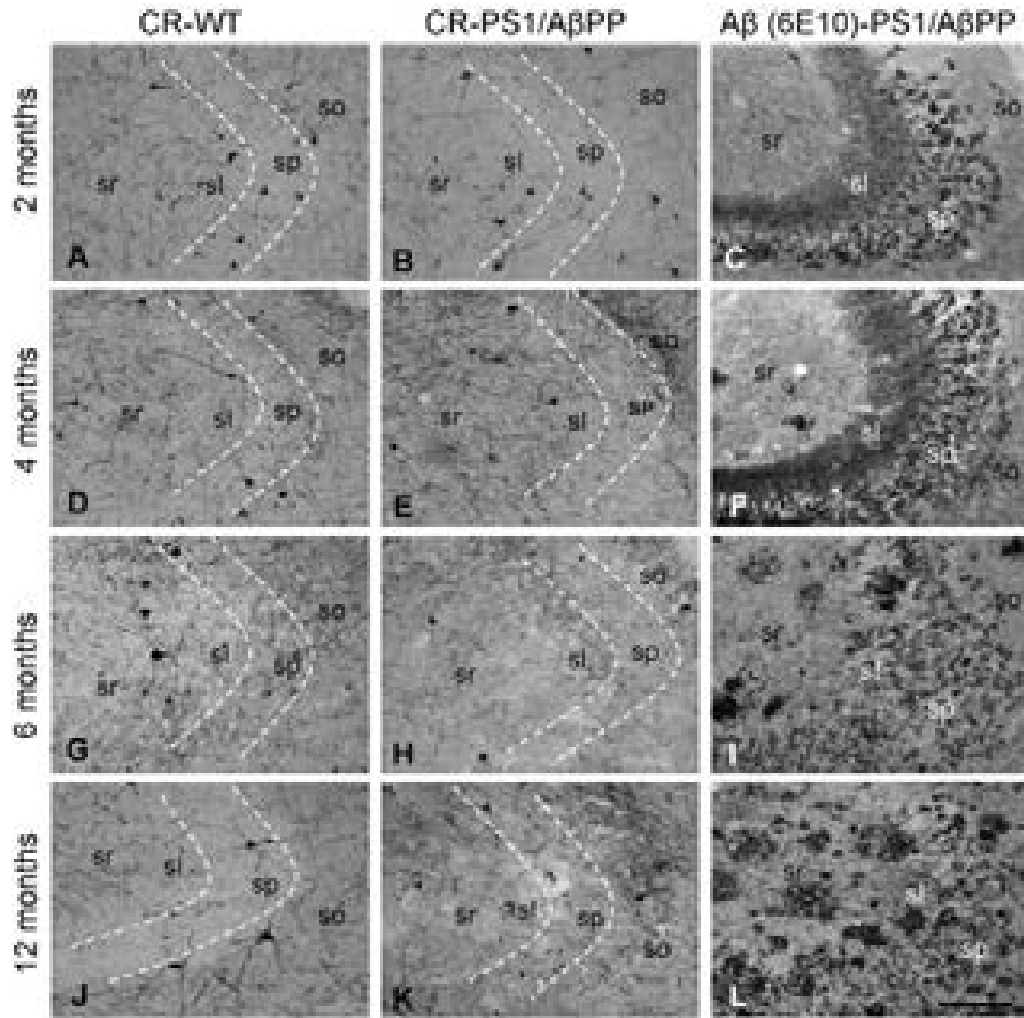


Fig. 2. CR-immunoreactive interneurons in hippocampal CA3 subfield. Light microscopic images of CR-immunoreactivity in CA3 subfield of WT (A-D-G-J) and PS1/A β PP (B-E-H-K) mice at 2, 4, 6, and 12 months of age. Most of CR-cell bodies were in strata oriens and radiatum. The number of CR-positive cell 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-

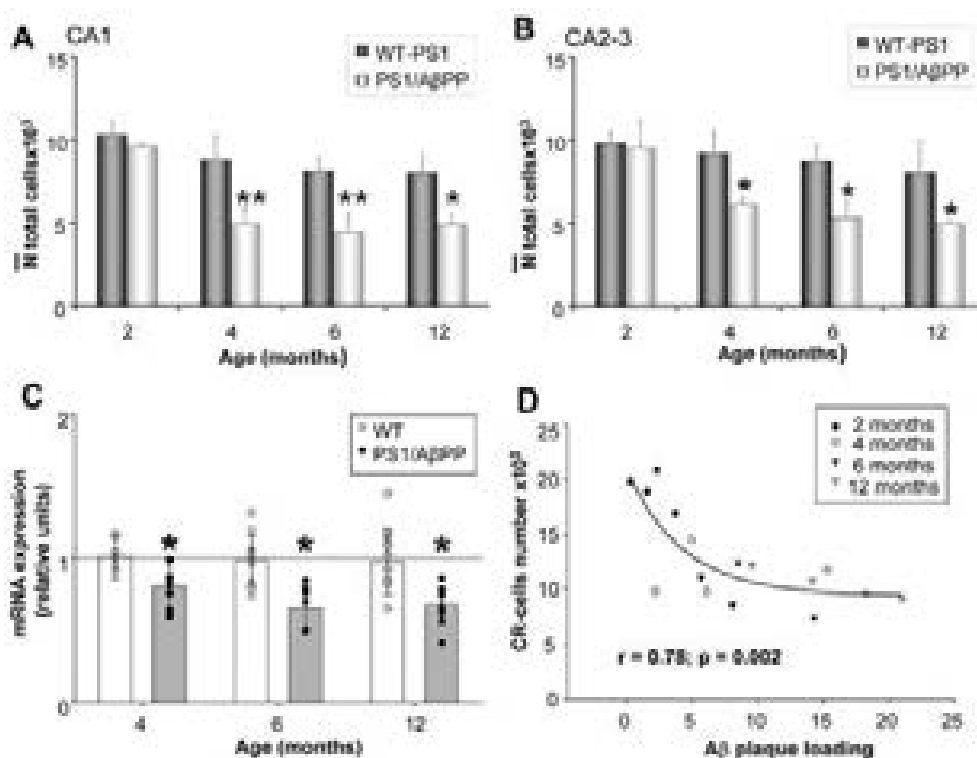


Fig. 3. Significant reduction of CR-interneurons in PS1/A β PP hippocampal formation at early ages. Stereological quantification of CR-positive cells in WT-PS1 and PS1/A β PP ($n = 5$ per genotype and age) demonstrated a significant decrease in PS1/A β PP compared to WT-PS1 mice since 4 months of age 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

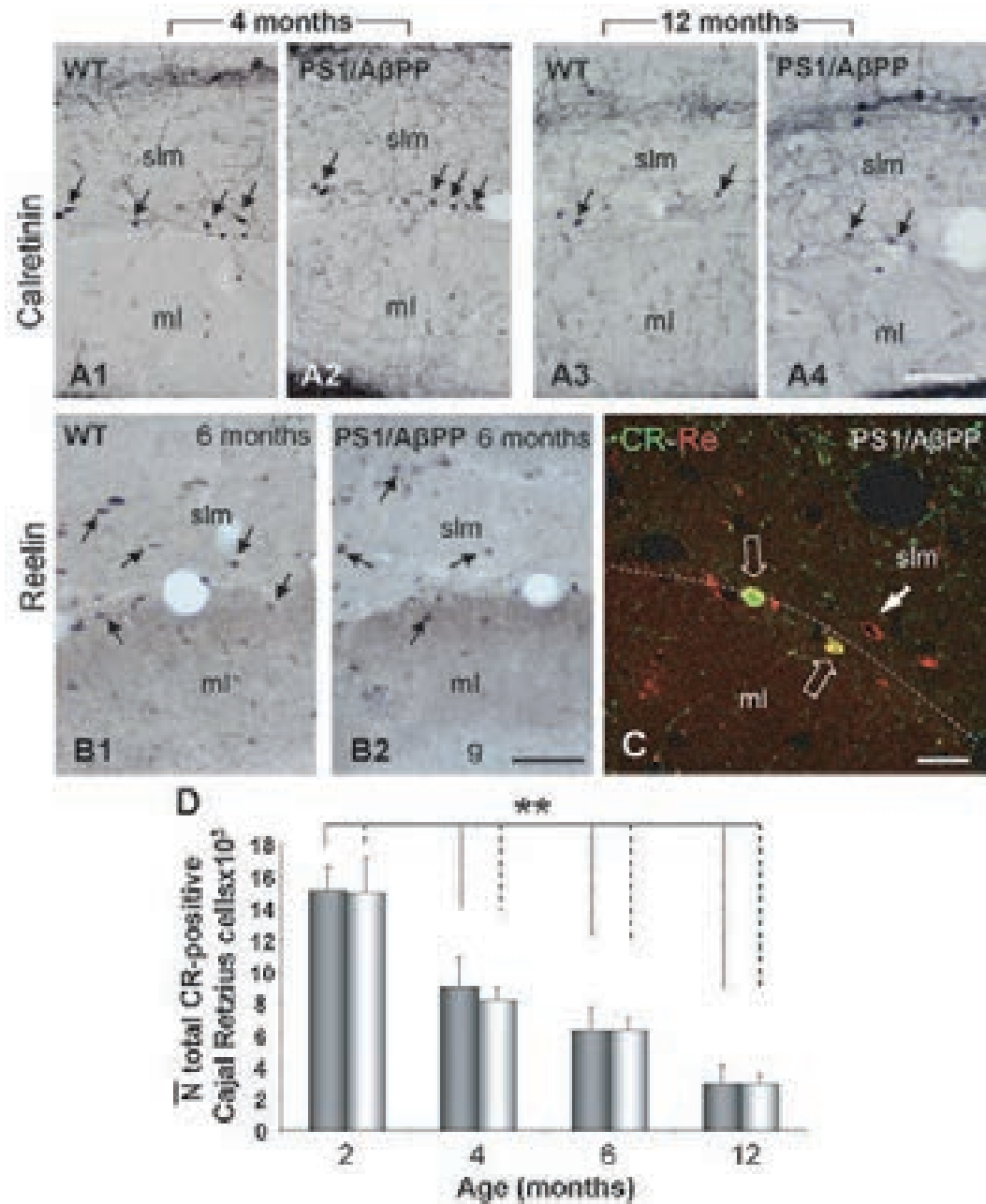


Fig. 4. CR-positive Cajal-Retzius cells are not affected by A β pathology. A) Light microscopy images of CR-positive cells (arrows) in hippocampal fissure of WT (A1 and A3) and PS1/A β PP (A2 and A4) mice at 2 (A1-A2) and 12 (A3-A4) months of age. B) Light microscopy images of Cajal-Retzius cells immunoreactive 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).

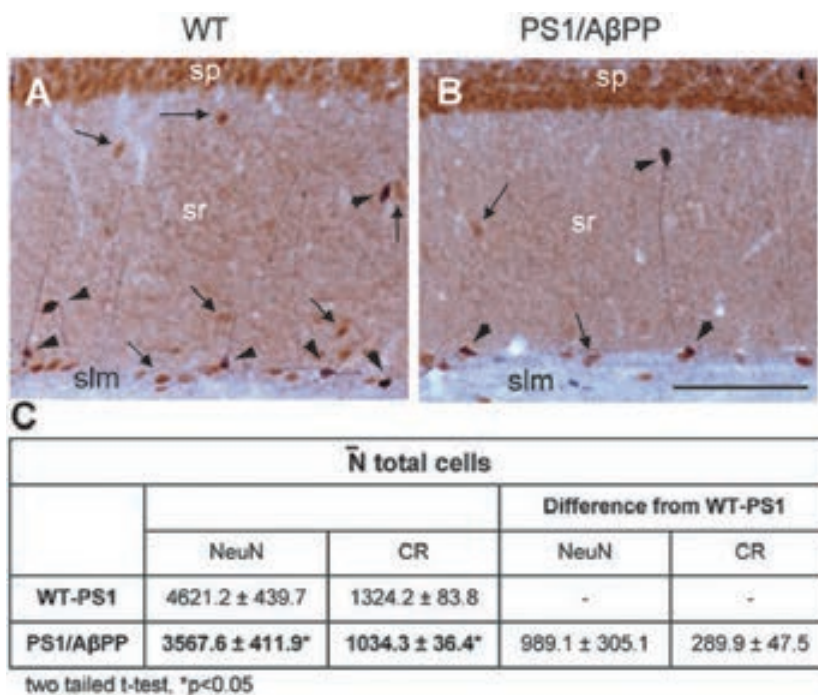


Fig. 5. Loss of CR-positive interneurons in PS1/A β PP hippocampus is due to a neurodegenerative process. A,B) Bright field microscopy images of double peroxidase immunolabeling for CR (dark blue) and NeuN (brown) in CA1 stratum radiatum of 4 month-old WT (A) and PS1/A β PP (B) mice. A reduced number 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.

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; Tricine, 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

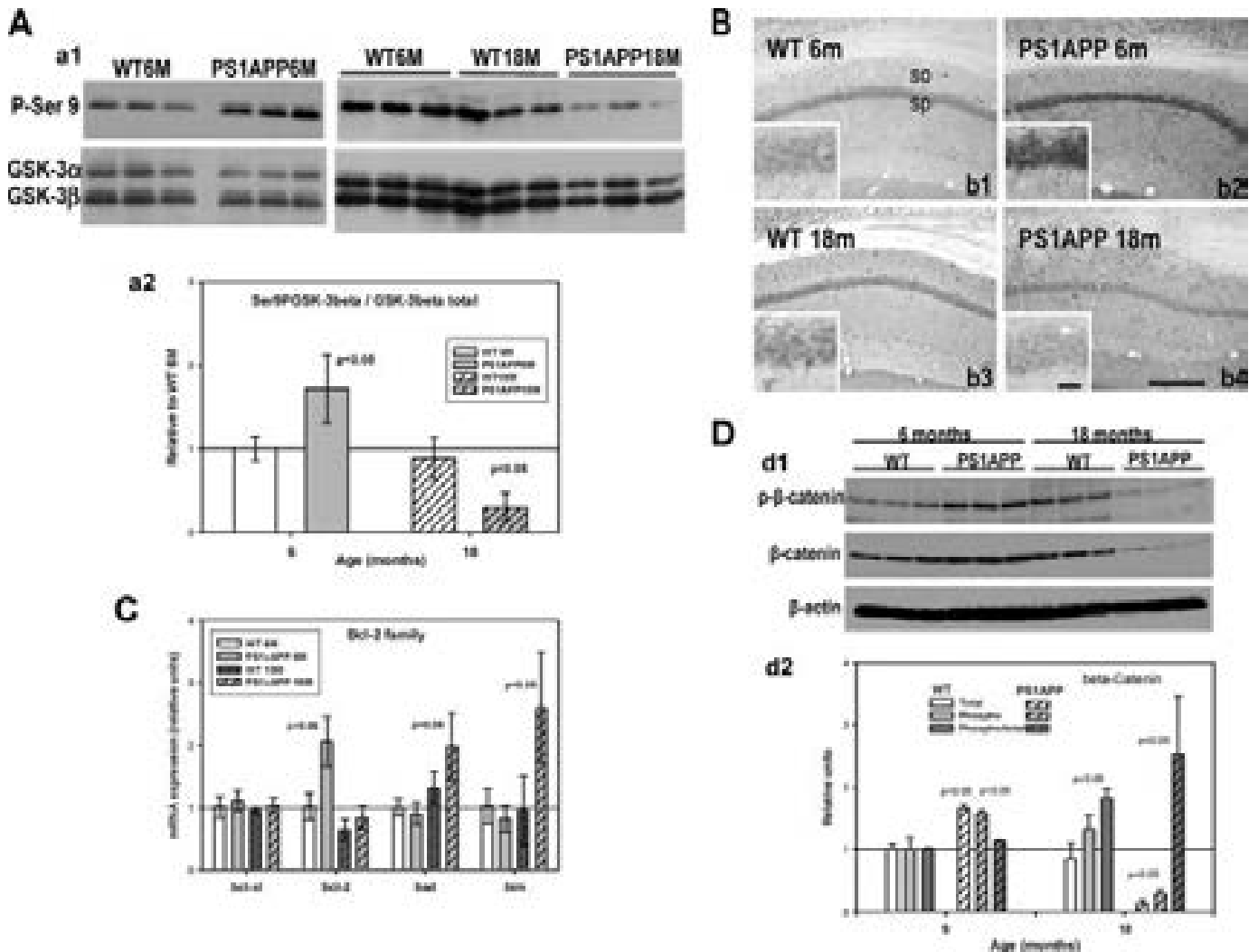


FIGURE 1. Age-dependent decrease on GSK-3 β phosphorylation (Ser-9) in PS1 \times APP hippocampus. *A*, relative phosphorylation levels of Ser-9 GSK-3 β (panel *a1*, upper panel) were determined, by Western blots, in 6- and 18-month-old WT and PS1 \times APP hippocampi. The Western blots were then reprobated for total GSK-3 β (panel *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- (panels *b1* and *b2*) and 18-month-old WT (panels *b3* and *b4*) and PS1 \times APP (panels *b2* and *b4*) mice. For these experiments, serial sections of 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. 2*A*, and quantitatively in Fig. 2*C*), 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. 2*A*), 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

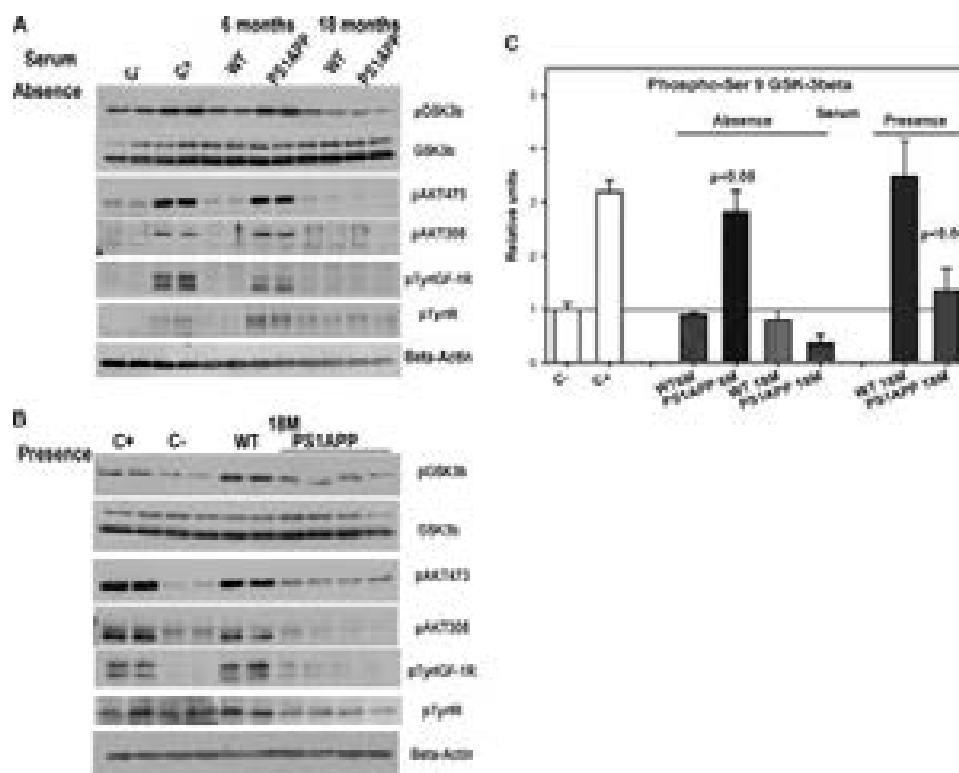


FIGURE 2. Soluble fractions, derived from 6- or 18-month-old PS1 \times APP mice, produced the stimulation or inhibition of Akt-GSK-3 β phosphorylation. A, N2a cultures were serum-deprived for 12 h and treated with 50 μ g of soluble proteins derived from young (6 months) or old (18 months) WT and PS1 \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

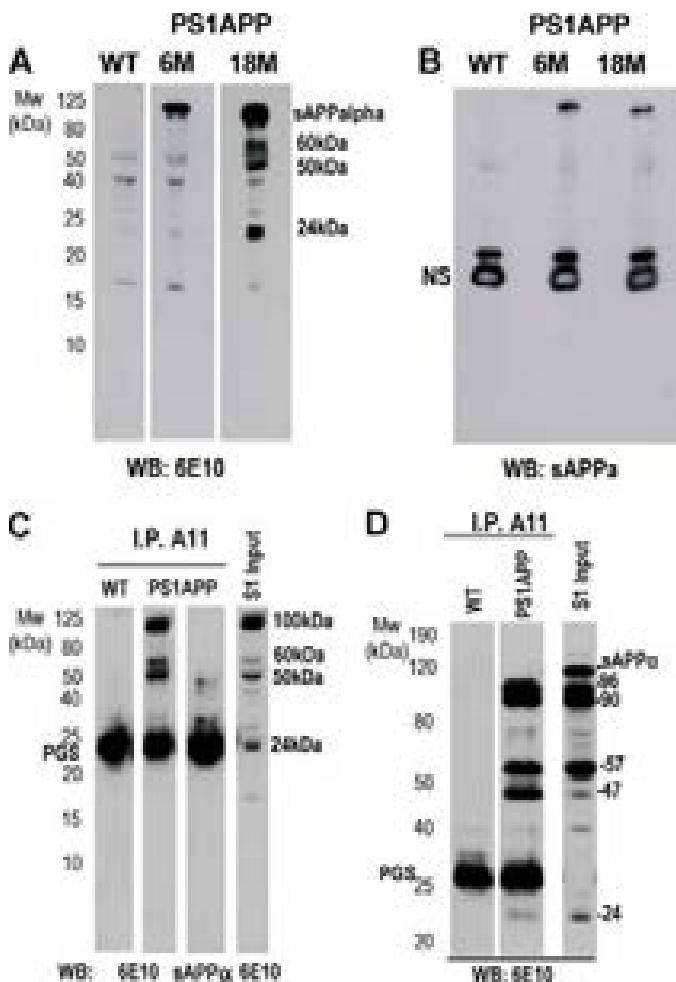


FIGURE 3. A β oligomeric forms in soluble extracts from 18-month PS1 \times APP. A, S1 fractions from 6 month-old WT and PS1 \times APP or 18-month PS1 \times APP were first analyzed by Western blot (16% SDS-Tris-Tricine-PAGE) using mAb 6E10. Results showed an age-dependent increase of soluble SDS-resistant 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 (IP) 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.

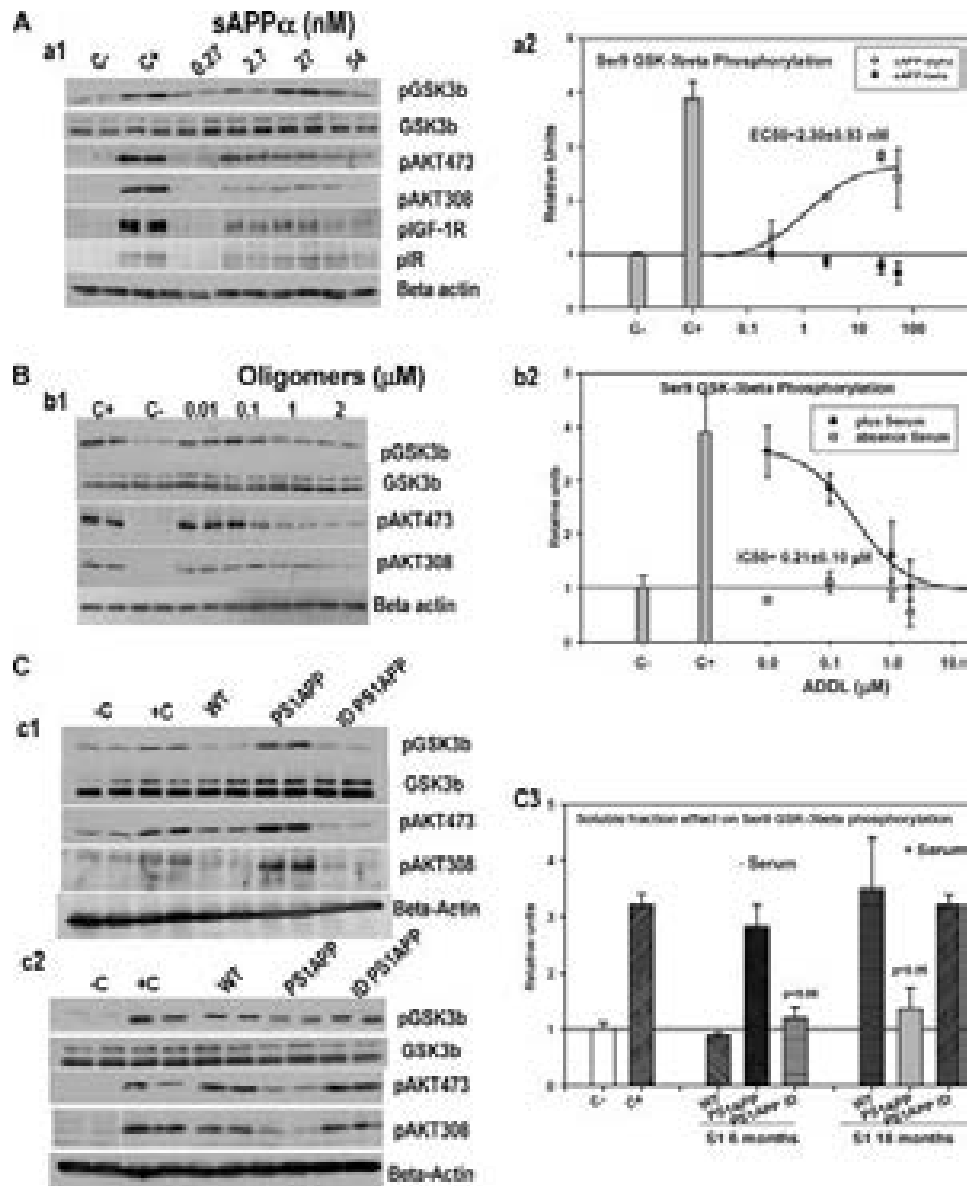


FIGURE 4. Synthetic sAPP α and A β oligomers (ADDLs) stimulated or inhibited the Akt-GSK-3 β phosphorylation in N2a cultures. *A*, sAPP α activated the IGF-1R/IR Akt GSK-3 β pathway. Serum-deprived N2a cultures were treated with increasing concentrations of synthetic sAPP α or sAPP β (data not shown), 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

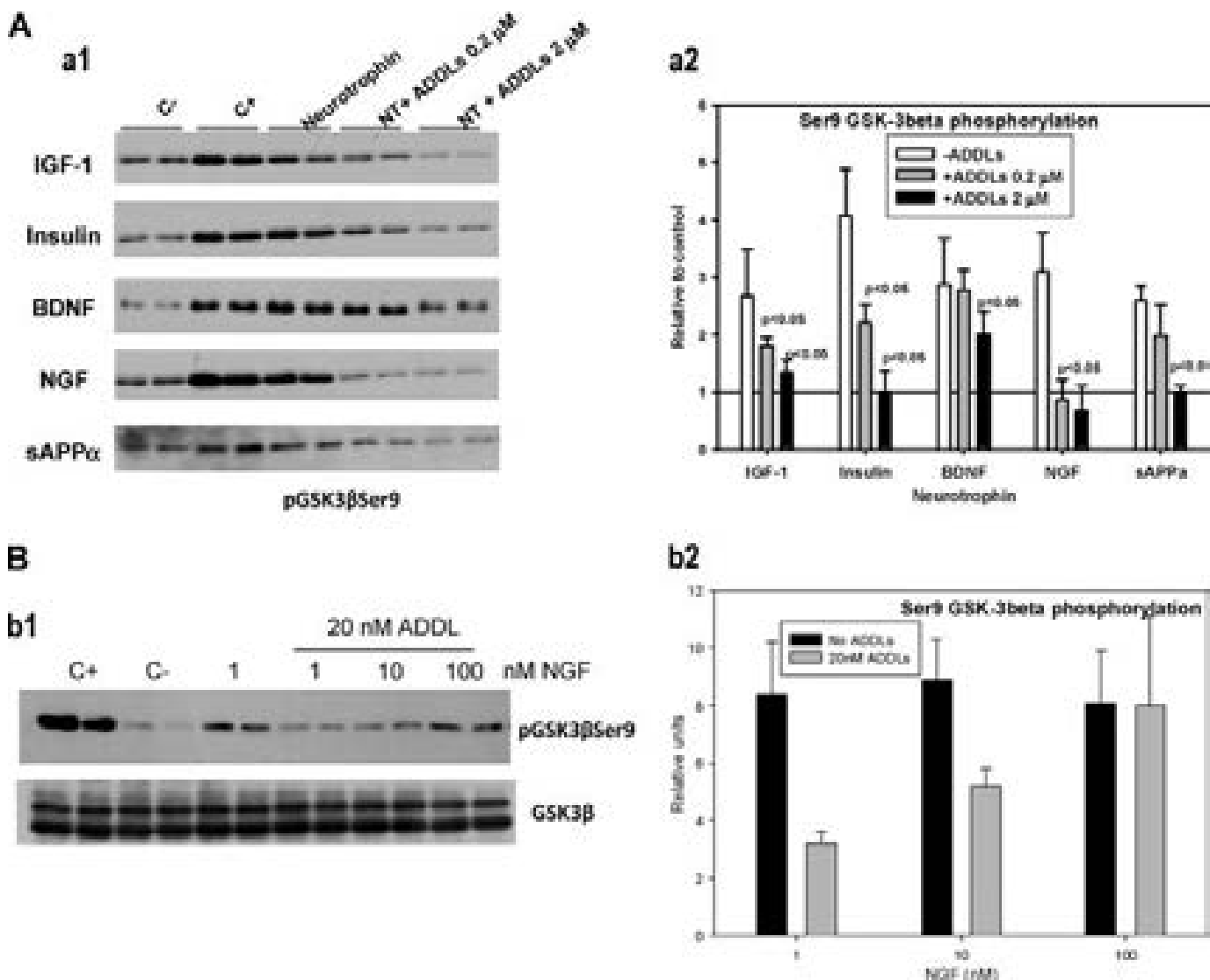


FIGURE 5. Synthetic A β oligomers (ADDLs) competed with different neurotrophins for the stimulation of Ser-9 GSK-3 β phosphorylation. *A*, for competition experiments, the Ser-9 GSK-3 β phosphorylation was stimulated by a fixed concentration of different neurotrophins and 0.2 or 2 μ M ADDLs. After treatment, the Ser-9 GSK-3 β 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-3 β 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 APP α and - β (data not shown) were the predominant APP peptides identified in the tg-soluble fractions. Although the monomeric A β could also produce a similar effect (data not shown) (40), no significant amounts of monomeric A β were detected in 6-month-derived soluble extracts.

The implication of sAPP α in the activation of the Akt pro-survival pathway was further demonstrated *in vitro*, using synthetic sAPP α . The sAPP α produced a dose-dependent activation of the Akt-GSK-3 β 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 \times APP brain-derived fractions was completely avoided by immunodepletion experi-

ments using 6E10. Furthermore, the estimated sAPP α concentration in the soluble fractions (\sim 20 nM) was in the range of the calculated EC₅₀ for synthetic sAPP α (2.3 nM). Interestingly, the sAPP β 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 sAPP α on Akt-GSK-3 β pathway has been directly demonstrated.

The present data cannot demonstrate, *in vivo*, a direct cause-effect relationship between the presence of sAPP α and GSK-3 β phosphorylation. However, we might postulate that, in our model, the overexpression of the tg APP produced increased amounts of sAPP α and, because of its agonist-like effect on the prosurvival receptors, could to some extent delay the A β pathology. In fact, although the increase in GSK-3 β phosphorylation was not observed in all APP-based tg models (48, 49), all models exhibited a considerable delay between the A β 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. Karlinski, R., Wilcock, D., Dickey, C., Ronan, V., Gordon, M. N., Zhang, W., Morgan, D., and Tagliavola, 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

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

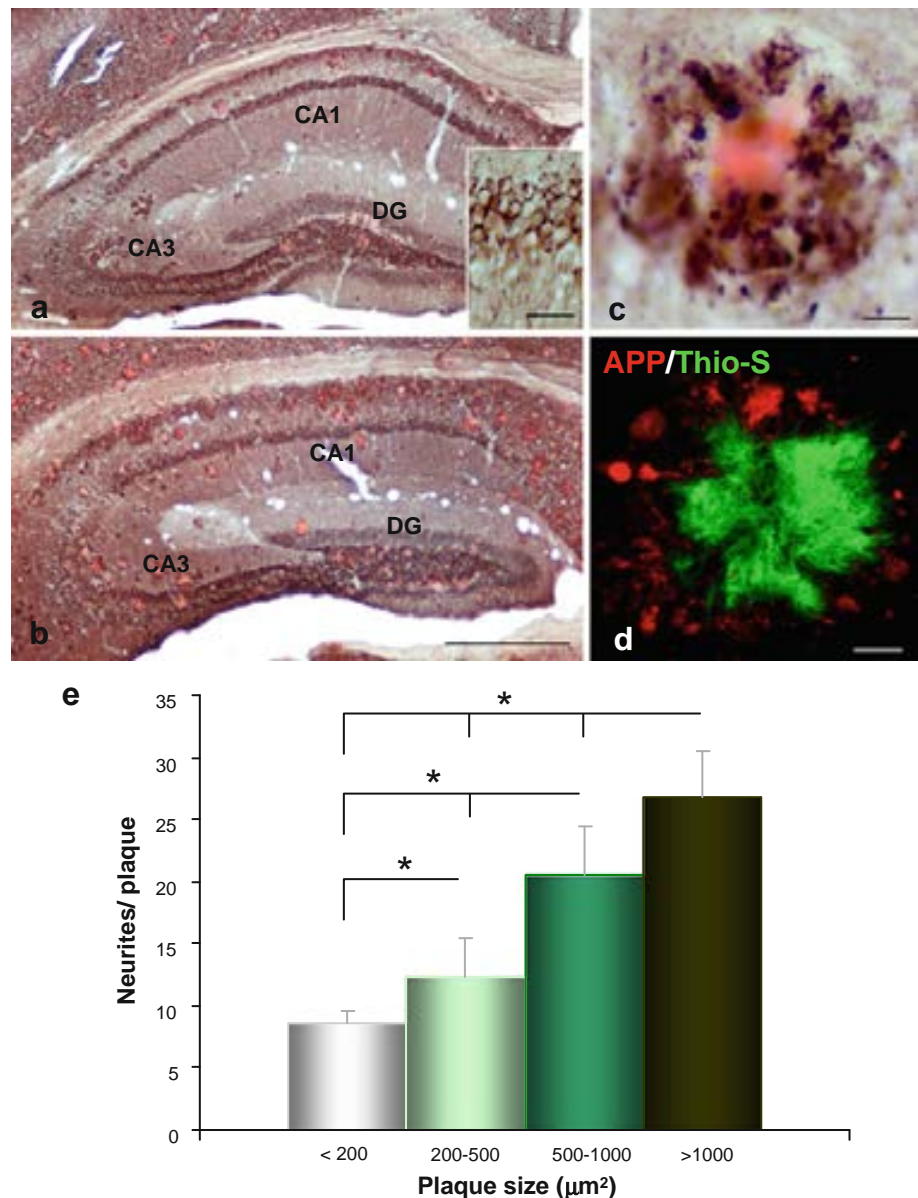
Data was expressed as mean \pm SD. The comparison between two mice groups (WT and PS1/APP mice or PS1 and PS1/APP tg mice) was done by two-tailed *t* test, and for comparing several groups (WT, PS1 and PS1/APP mice) and ages we used one-way ANOVA, followed by Bonferroni post hoc multiple comparison test (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

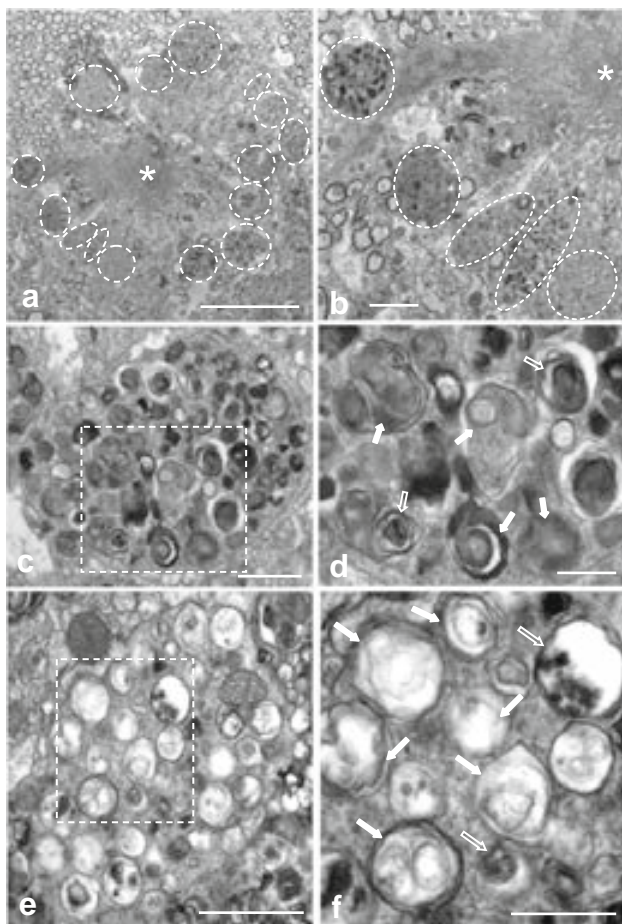


Fig. 2 Extensive accumulation of autophagic vesicles within dystrophic neurites around amyloid plaques. Transmission electron microscopy images of plaque-associated aberrant neurites in young PS1/APP hippocampus. **a** Low magnification image of an amyloid plaque (*asterisk*) surrounded by dystrophic 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).

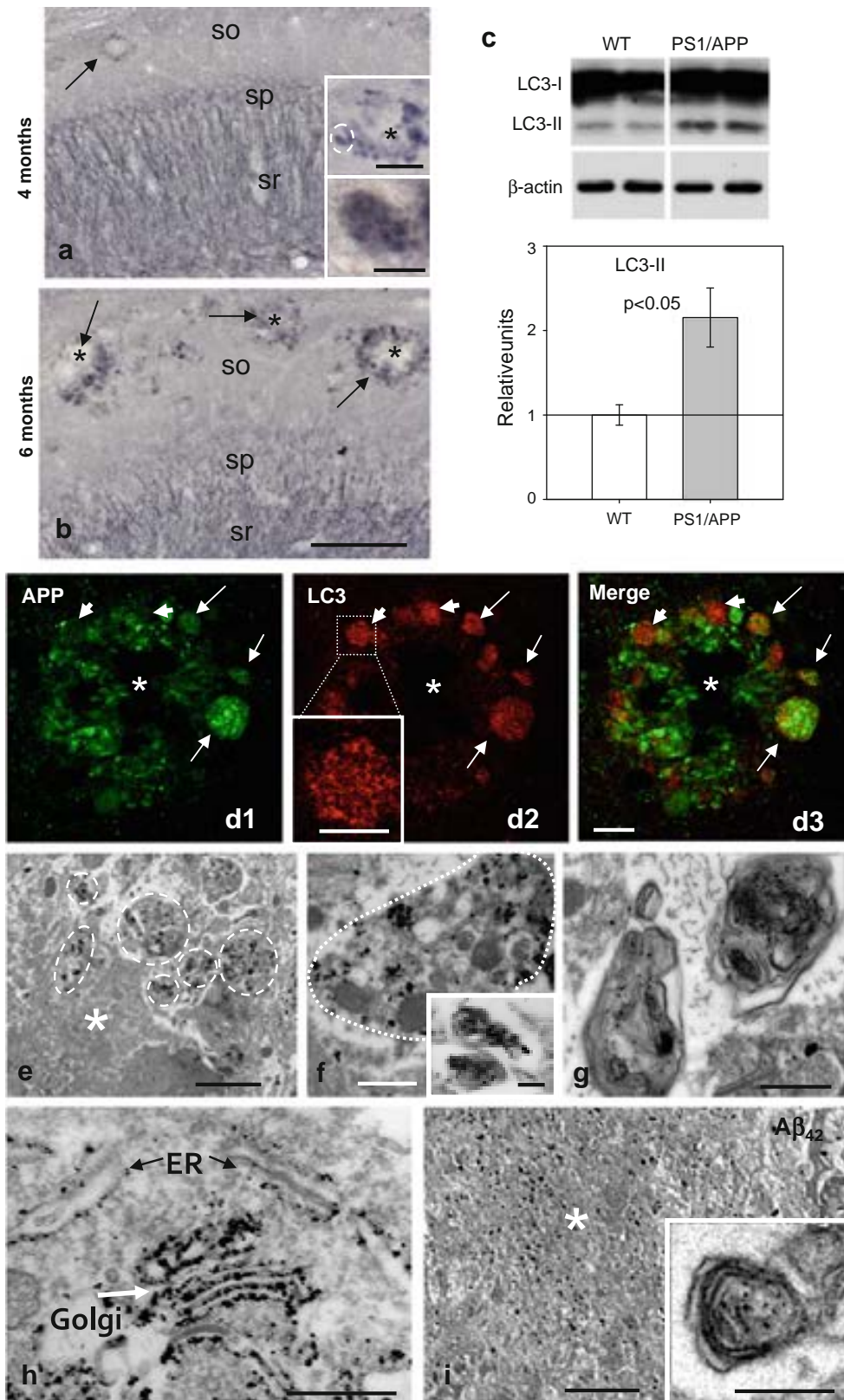
In addition, electron microscopy in the hippocampus of 4.5-month-old PS1/APP mice confirmed the presence of some dystrophic myelinated axons around/near plaques (Fig. 4h–j). These axonal dystrophies had a severe (Fig. 4h, i) to moderately (not shown) pathological number of autophagic vesicles. The enlarged 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 autophagosome 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.

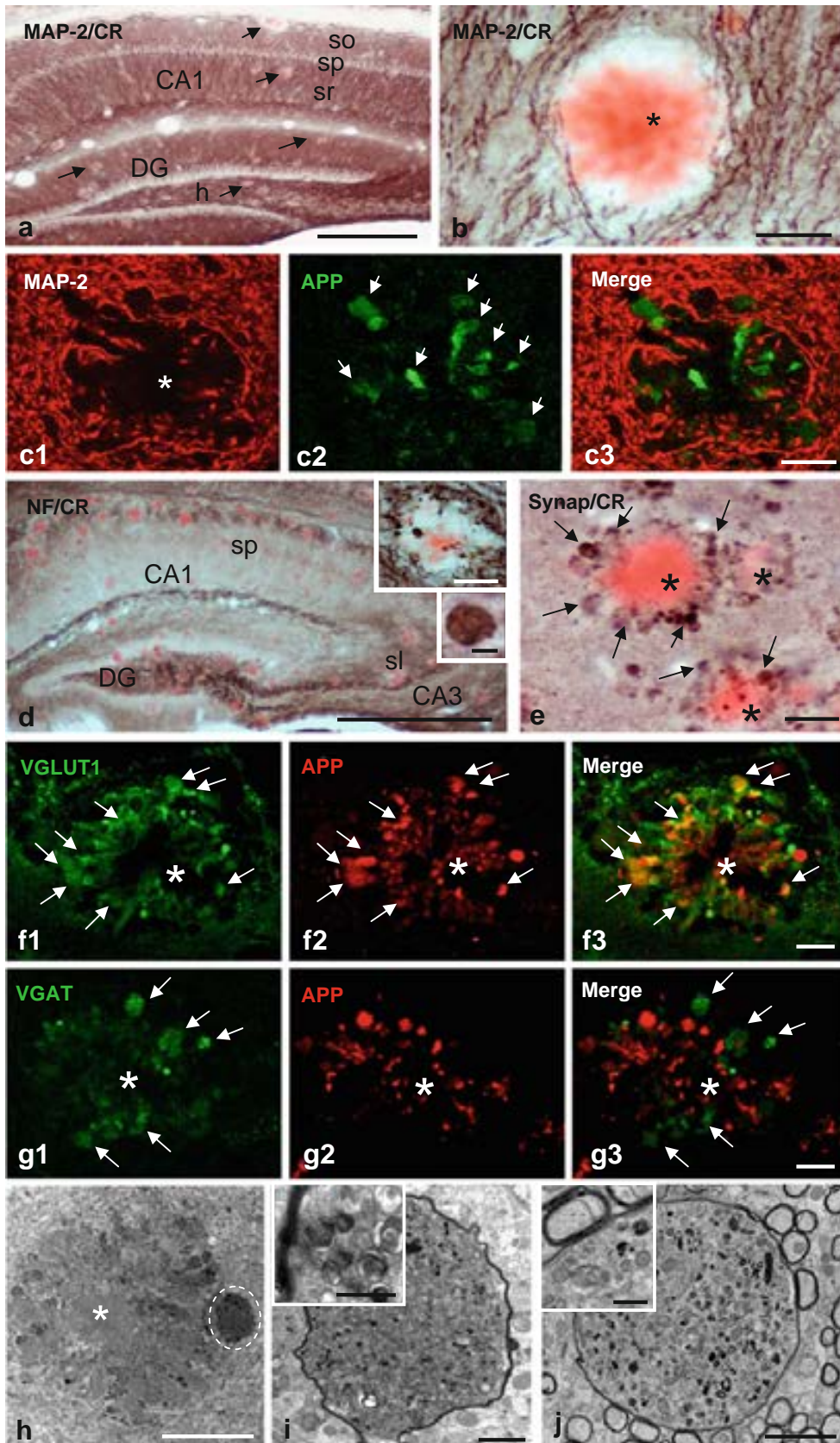
Moreover, we compared the LC3-II accumulation in synaptosomal and microsomal fractions isolated from 6-month-old WT and PS1/APP animals (Fig. 6f). As expected, a low percentage of LC3-II was observed in isolated synaptosomes from WT mice ($15.42 \pm 2.25\%$, $n = 4$, of microsomal fractions in WT mice). 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

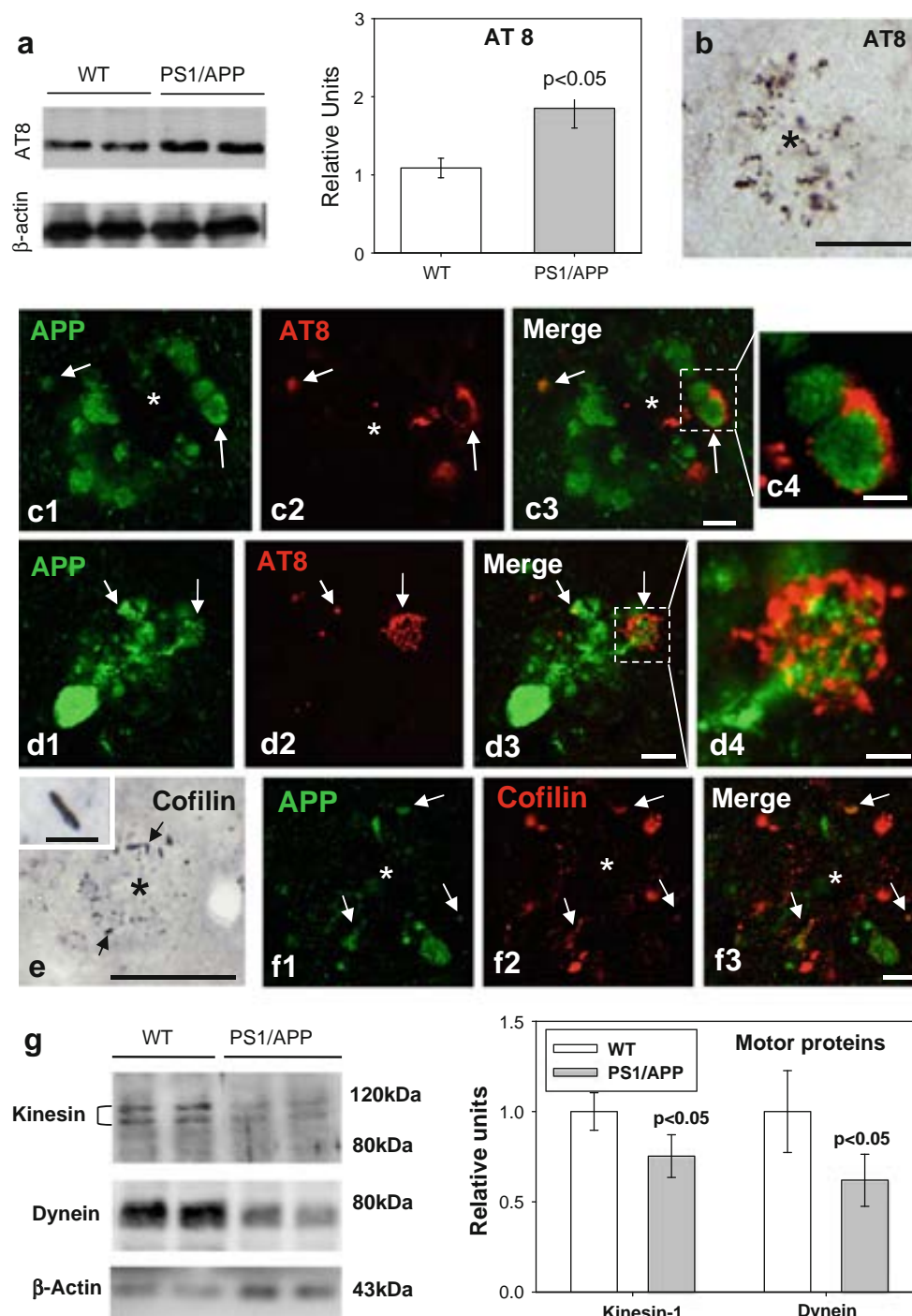


Fig. 5 Cytoskeletal pathology in young PS1/APP hippocampus. **a** Quantitative Western blotting using AT8 antibody in the hippocampus of 6-month-old PS1/APP and WT mice; PS1/APP mice had significantly higher AT8 levels than to age-matched WT mice ($n = 6$, $p < 0.05$). **b** The presence of AT8-positive 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 μ m, **c1–c3** 5 μ m, **c4** 2.5 μ m, **d1–d3** 7.5 μ m, **d4** 2.5 μ m, **e** 50 μ m (*inset* 7 μ m), **f1–f3** 7.5 μ m

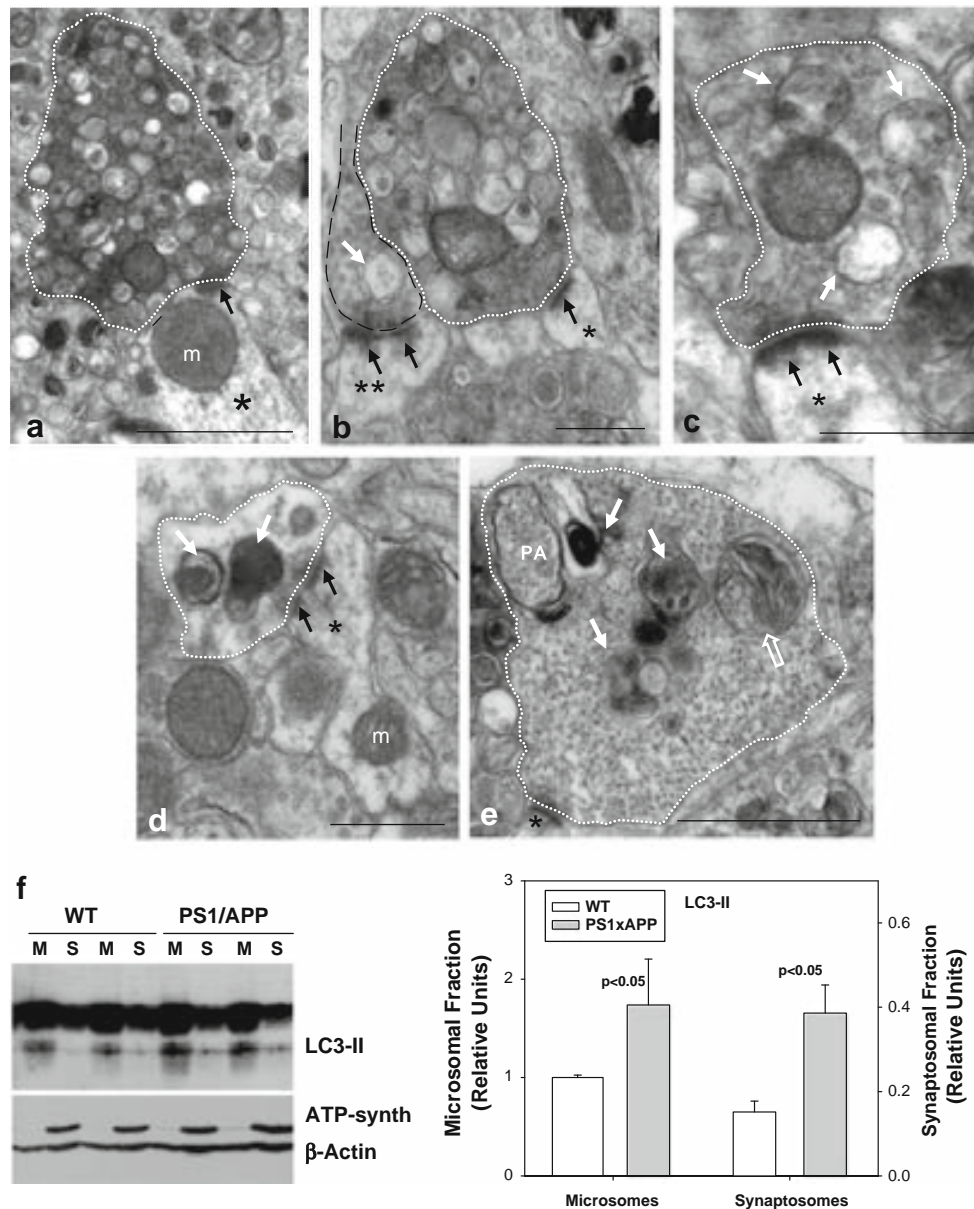


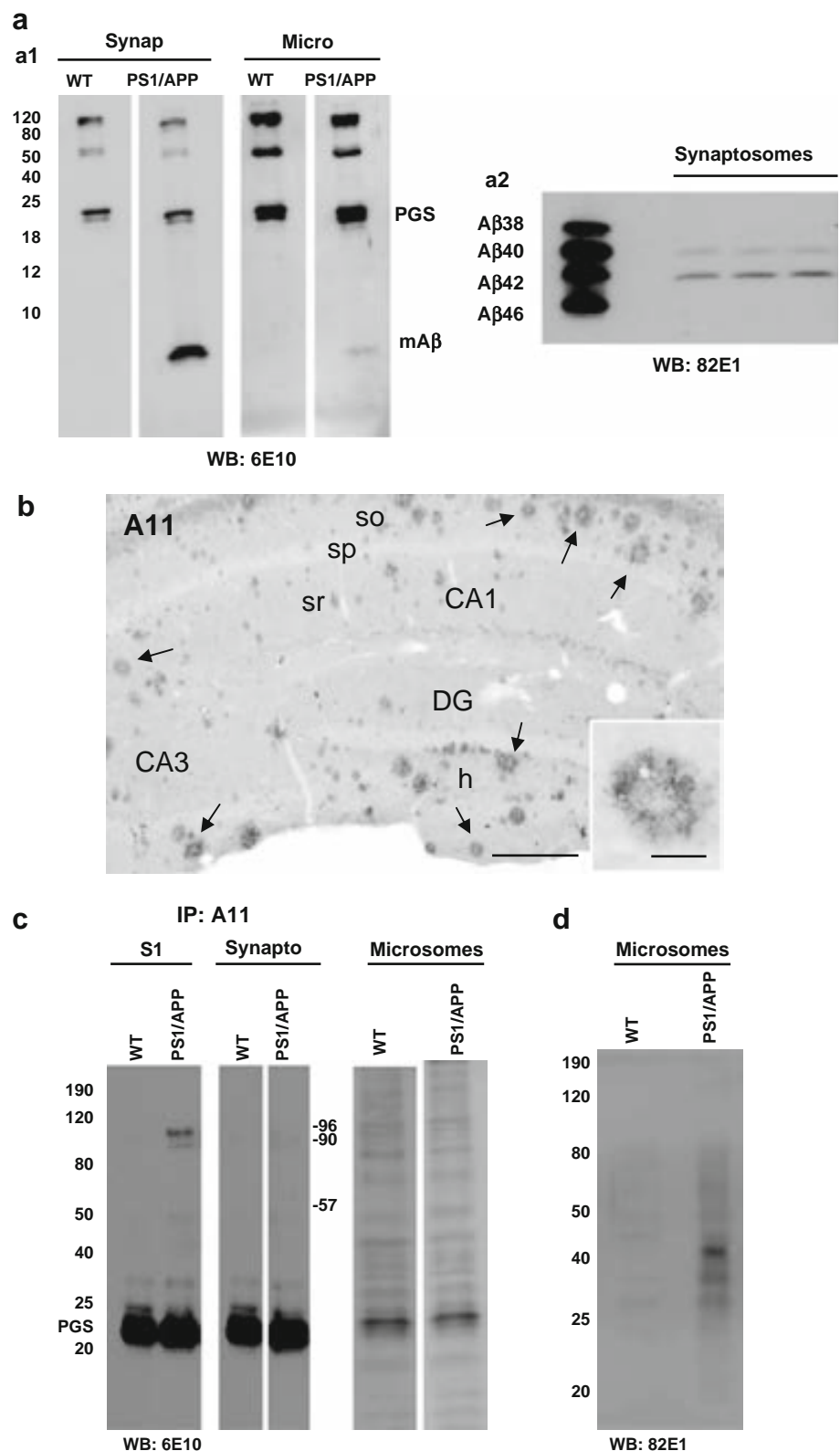
Fig. 6 Autophagy pathology correlates with aberrant presynaptic terminals. **a–e** Transmission electron microscopy images of aberrant axon terminals (outlined with white lines) containing autophagic vesicles and making asymmetric contact with normal postsynaptic elements (asterisks the postsynaptic 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 Ca²⁺ 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

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].

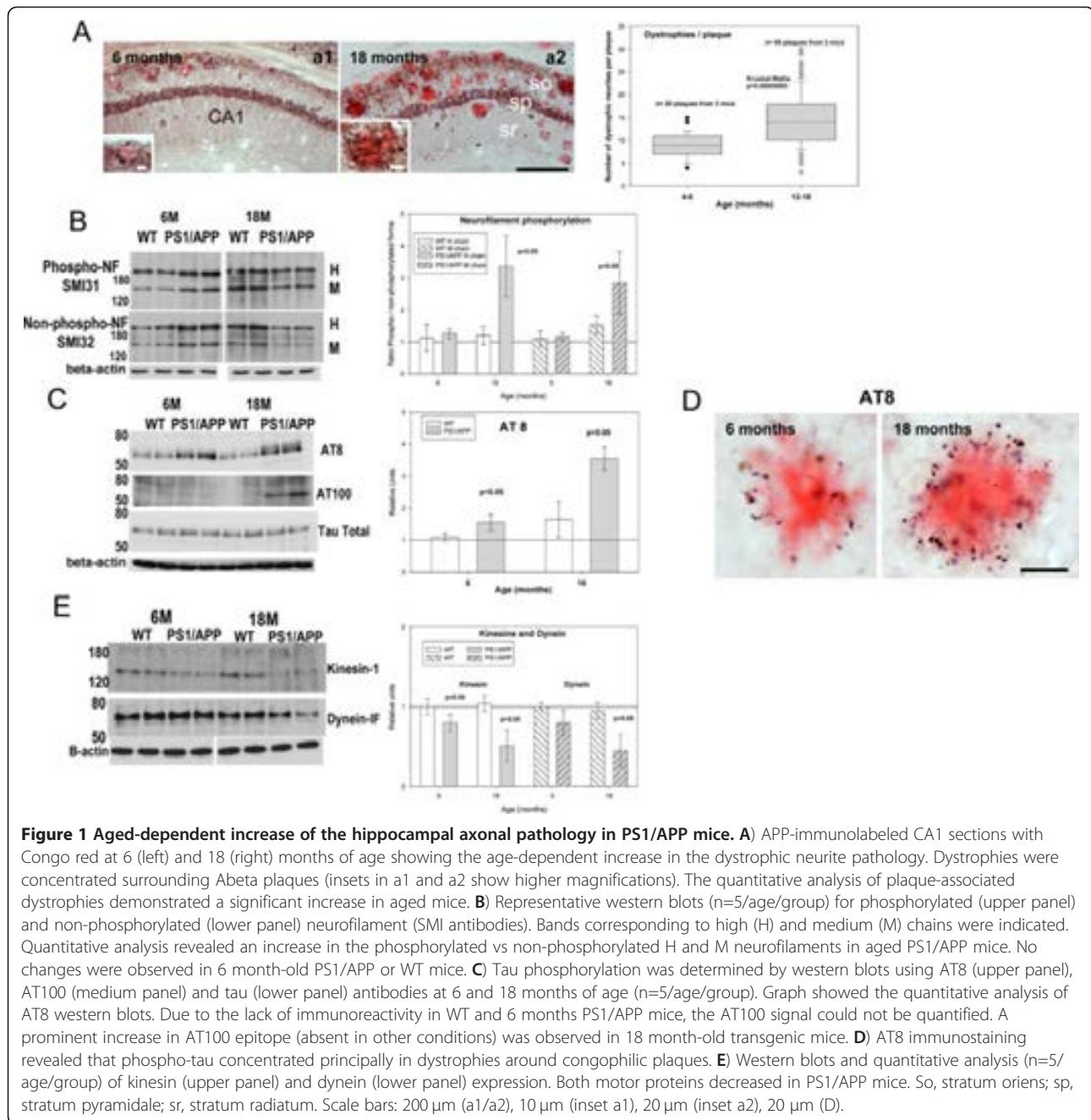
In the present work we investigated how the possible age-related relationship between aberrant Abeta generation and dysfunctions in axonal cytoskeleton as well as in lysosomal and proteasomal systems, manifested in our PS1/APP AD model. We proposed that the decrease in lysosomal proteolytic activities 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



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,

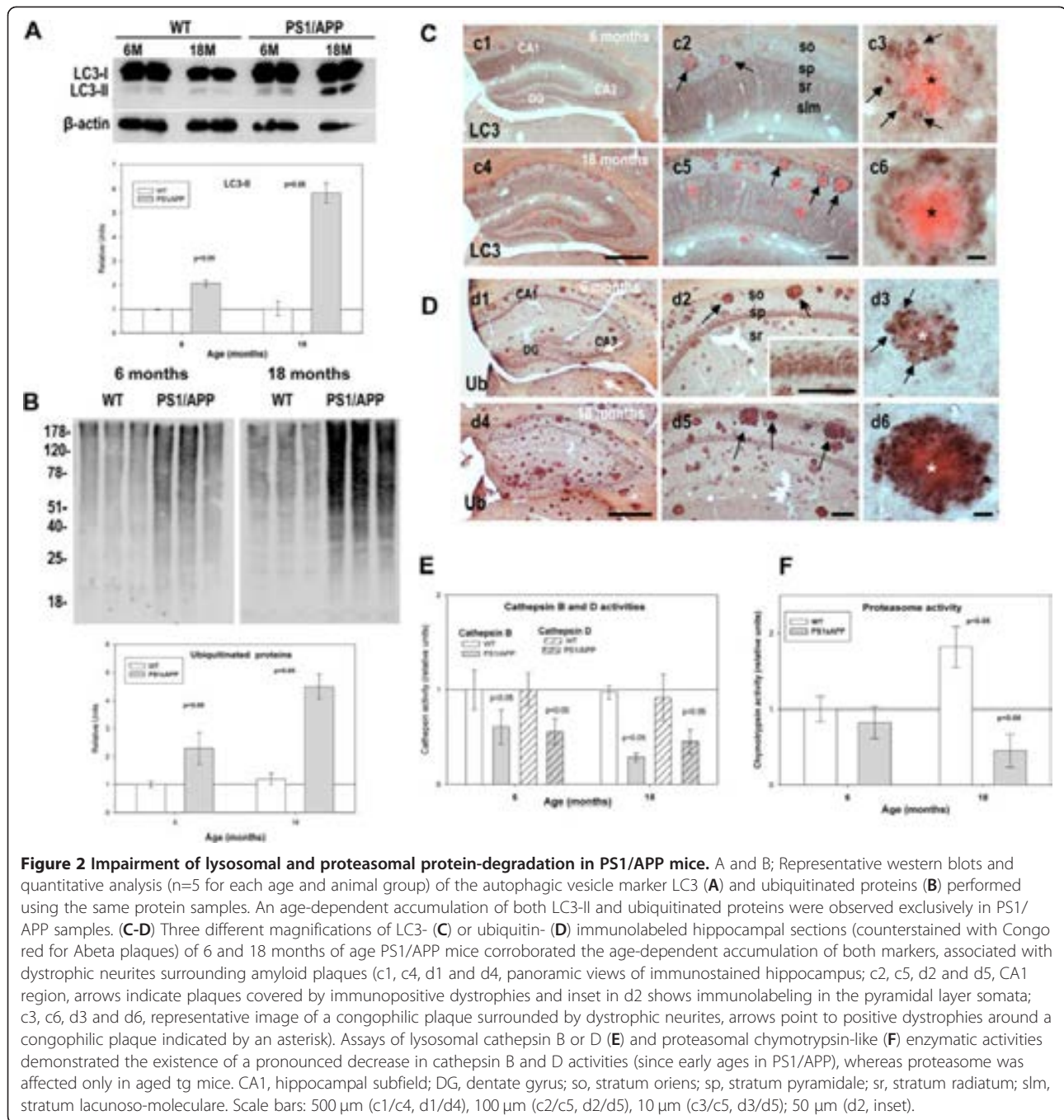
not shown). On the other hand, the proteasomal activity (Figure 2F) also displayed a slight, and not significant diminution at 6-months ($-20.4 \pm 12.3\%$, $n=4$) followed by a more pronounced inhibition in aged PS1/APP mice ($-45.5 \pm 15.6\%$; $n=4$; $p<0.05$). No differences between WT and PS1/APP 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

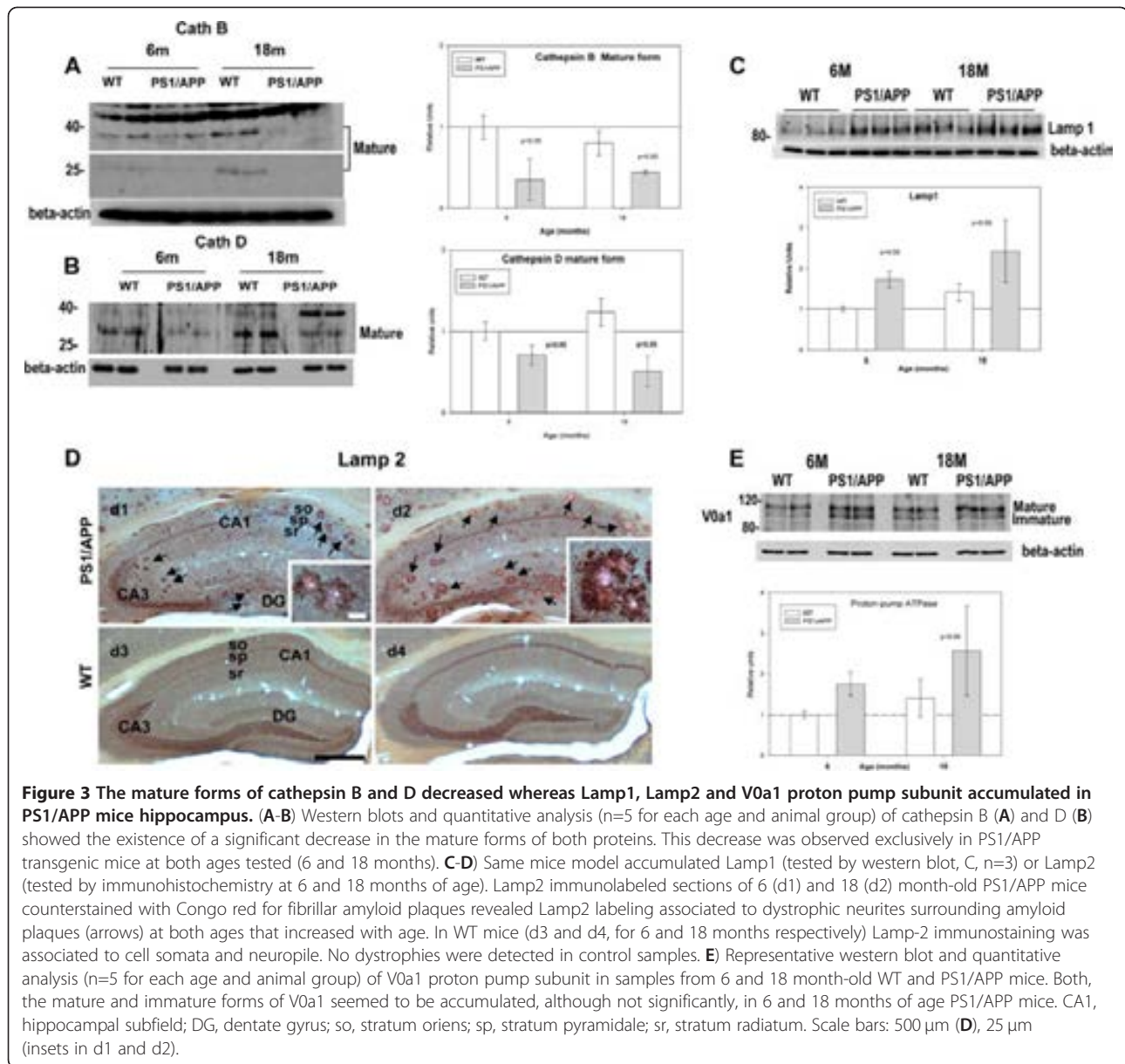
Data so far demonstrated the existence of a progressive age-dependent neuritic (probably axonal) pathology in the PS1/APP model that affected the intracellular proteolytic systems. We next evaluated whether this progressive pathology could affect the amyloidogenic APP processing. As shown (Figure 4A), 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,



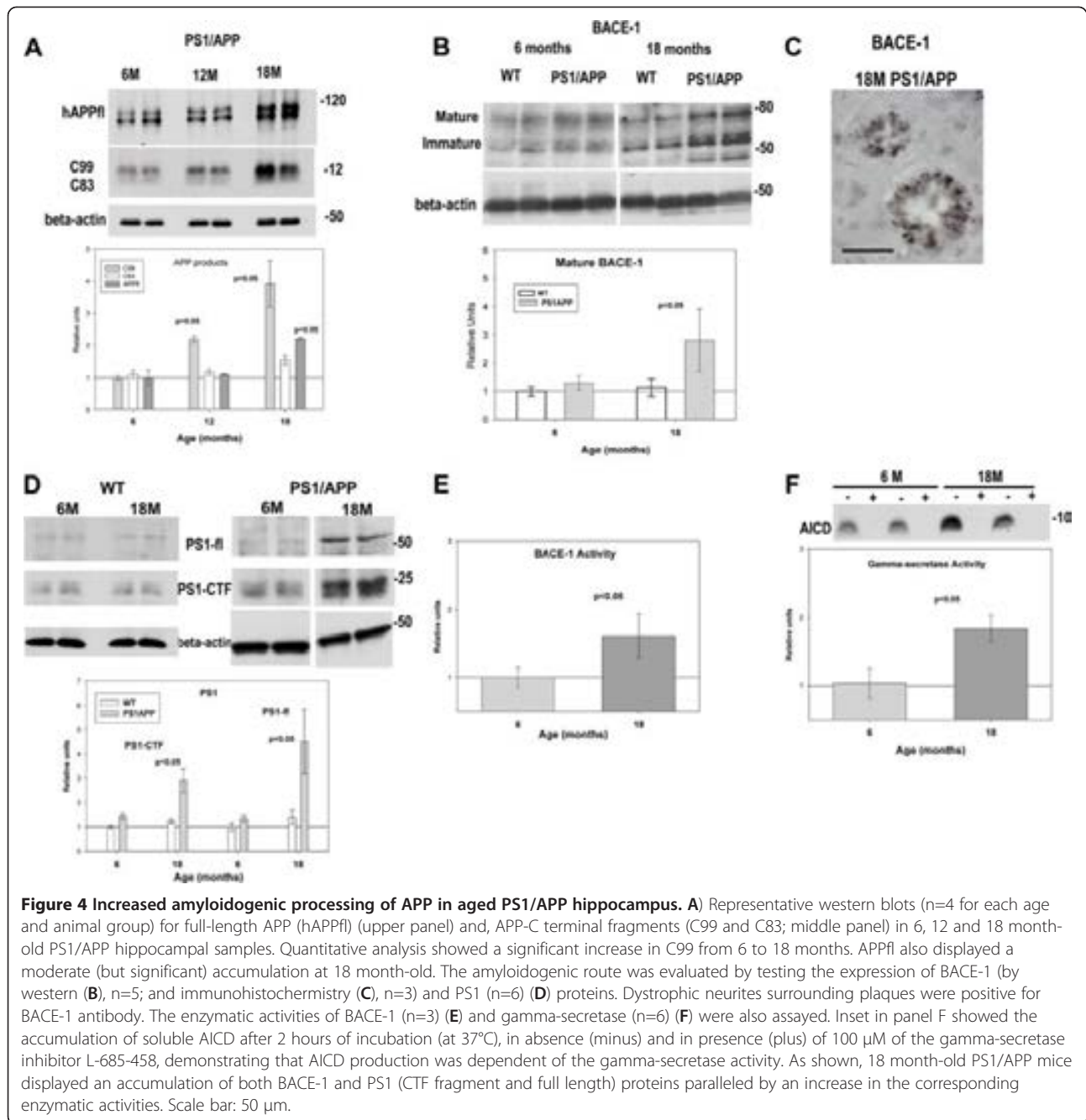
from 6 to 18 month in PS1/APP mice whereas C83 levels were low (respect to C99) and remained practically unaltered during aging (see also Figure 5). Together with the accumulation of APP and APP-fragments, we also observed an increase in the levels of both BACE-1 and PS1 proteins. As shown, Figure 4B, 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

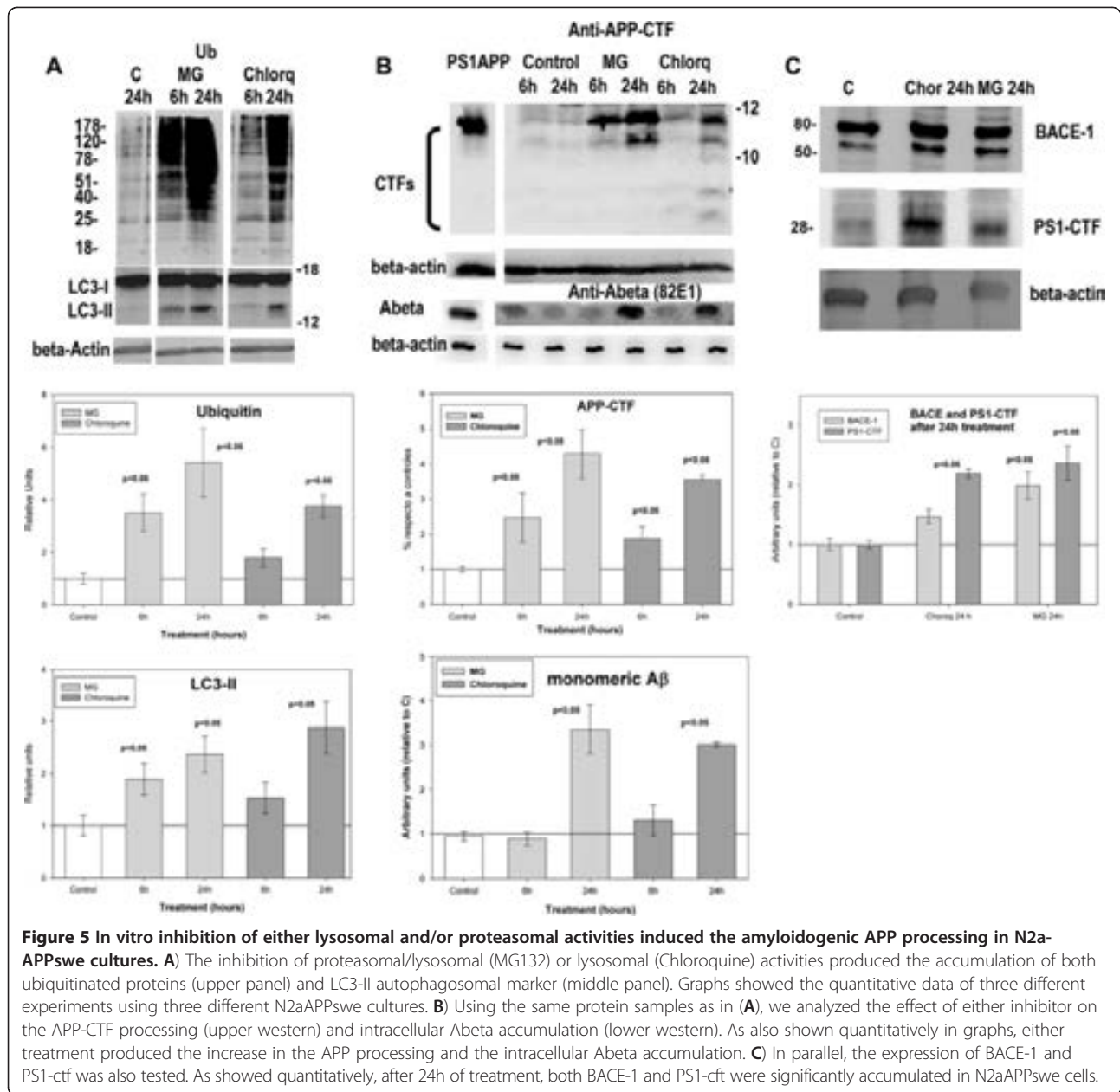
[34]). Thus, these data were consistent with an age-dependent increase in gamma-secretase. In fact, the gamma-secretase activity, determined as the rate of AICD production using fresh membranes isolated from different ages (in consequence, the substrate was the endogenous APP-CTF fragments, presented 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 N2aAPPswe 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

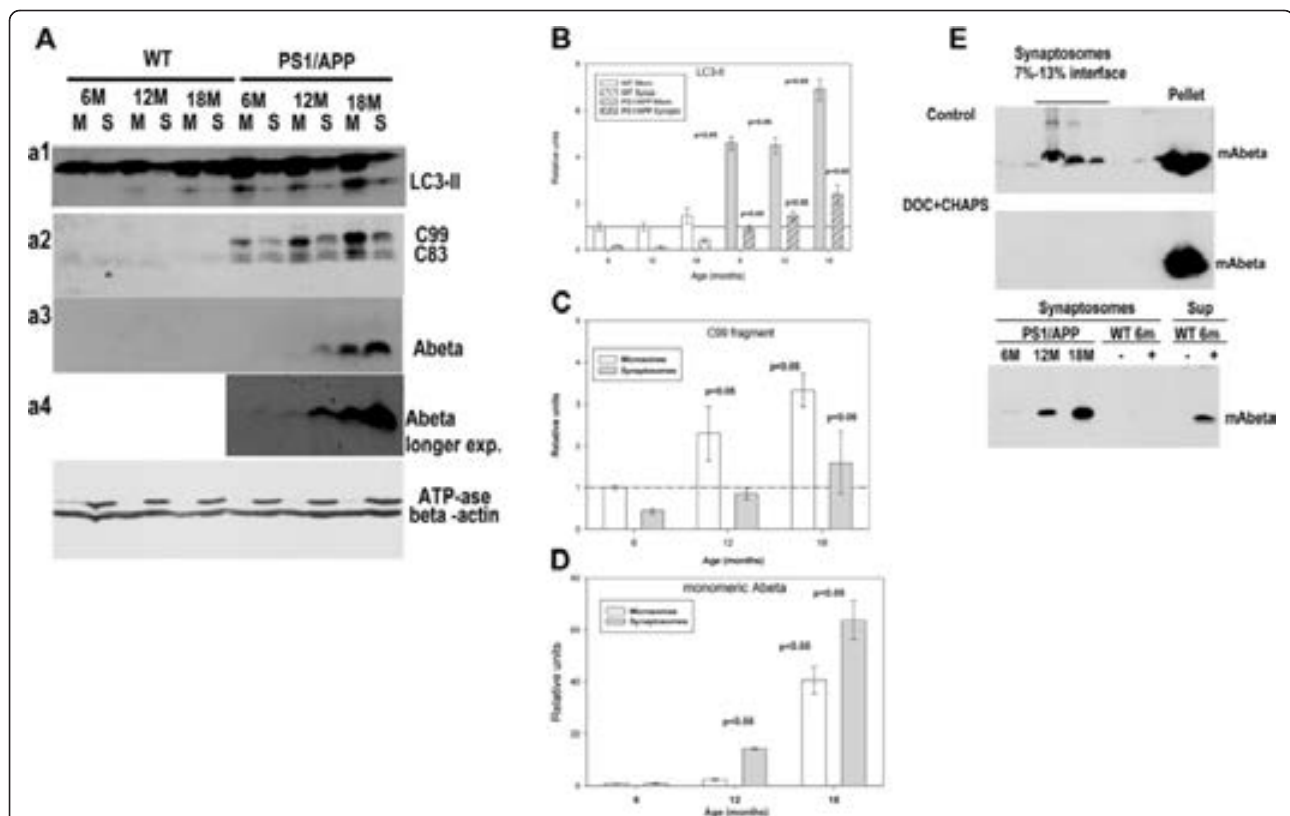
isolated synaptosomes. If the neuritic pathology in this model was predominantly, although not exclusive, of axonal origin, the observed modifications should produce the accumulation of APP-derived peptides (including Abeta) at the presynaptic terminals. In fact, we have recently reported the existence 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 hemisector 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

- Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA: **Alzheimer Disease.** *Dis Mon* 2010, **56**:484–546.
- Su JH, Cummings BJ, Cotman CW: **Identification and distribution of axonal dystrophic neurites in Alzheimer's disease.** *Brain Res* 1993, **625**:228–237.
- 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.
- Nixon RA: **Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease.** *J Cell Sci* 2007, **120**:4081–4091.
- 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.
- 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.
- Nixon RA, Yang DS: **Autophagy failure in Alzheimer's disease—locating the primary defect.** *Neurobiol Dis* 2011, **43**:38–45.
- Nixon RA, Yang DS: **Autophagy failure in Alzheimer's disease—locating the primary defect.** *Neurobiol Dis* 2011, **43**:38–45.
- 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.
- 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 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.
- 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.
- LaFerla FM, Green KN, Oddo S: **Intracellular amyloid-[beta] in Alzheimer's disease.** *Nat Rev Neurosci* 2007, **8**:76–82.
- Aguzzi A, Haass C: **Games played by rogue proteins in prion disorders and Alzheimer's disease.** *Science* 2003, **302**:814–818.
- Cao X, Sudhof TC: **Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation.** *J Biol Chem* 2004, **279**:24601–24611.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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, Spone I, 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 Cargo 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, Veeraghavalu 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-Stenner 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, Westermark 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. Gavilan MP, 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.

ARTICLE

Received 19 Jun 2012 | Accepted 15 Jan 2013 | Published 19 Feb 2013

DOI: 10.1038/ncomms2494

Smoking exacerbates amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease

Ines Moreno-Gonzalez^{1,*}, Lisbell D. Estrada^{2,*}, Elisabeth Sanchez-Mejias³ & Claudio Soto¹

Several epidemiological studies have shown that cigarette smoking might alter the incidence of Alzheimer's disease. However, inconsistent results have been reported regarding the risk of Alzheimer's disease among smokers. Previous studies in experimental animal models have reported that administration of some cigarette components (for example, nicotine) alters amyloid- β aggregation, providing a possible link. However, extrapolation of these findings towards the *in vivo* scenario is not straightforward as smoke inhalation involves a number of other components. Here, we analysed the effect of smoking under more relevant conditions. We exposed transgenic mouse models of Alzheimer's disease to cigarette smoke and analysed the neuropathological alterations in comparison with animals not subjected to smoke inhalation. Our results showed that smoking increases the severity of some abnormalities typical of Alzheimer's disease, including amyloidogenesis, neuroinflammation and tau phosphorylation. Our findings suggest that cigarette smoking may increase Alzheimer's disease onset and exacerbate its features and thus, may constitute an important environmental risk factor for Alzheimer's disease.

Alzheimer's disease (AD) is the most common type of senile dementia in the elderly population. Histopathologically, AD is characterized by the extracellular accumulation of misfolded amyloid- β ($A\beta$) into senile plaques and the formation of neurofibrillary tangles, which are filamentous intracellular inclusions formed by hyperphosphorylated tau. Other AD lesions include a massive inflammatory response, characterized by activated microglia and reactive astrocytes, synaptic impairment and neuronal loss in selective areas of the brain^{1,2}. The aetiology of sporadic AD is not well known, but several risk factors have been shown to increase the probability of developing the disease³. Although the main risk factor for AD is aging, various other factors have also been proposed, including gender, ApoE polymorphism, the coexistence of other disorders (such as cardiovascular diseases, brain injury, diabetes and Down syndrome) and several lifestyle conditions, including physical activity, education, diet or smoking^{4,5}.

The effects of smoking on AD remain unclear. For many years, smoking was considered to be protective for the development of AD^{6,7}. It was proposed that acute stimulation of neuronal nicotinic receptors may have beneficial effects on people with AD⁸ and that prolonged treatment may have further benefits by increasing neuronal survival⁹. Furthermore, it was reported that nicotine can decrease amyloid precursor protein (APP) secretion in animal models^{10,11}, inhibit acquisition of β -sheet conformation by $A\beta$ peptide¹², diminish its aggregation¹³, reduce β -amyloidosis¹⁴ and prevent memory impairment¹⁵. In fact, cotinine, the main metabolite of nicotine, is able to reduce $A\beta$ deposition by inhibiting its oligomerization and decrease memory impairment in transgenic AD mice¹⁶. Moreover, some studies have found that smoking is able to reduce $A\beta_{42}$ levels both in control and AD patients¹⁷. However, more recent epidemiological studies have demonstrated that smoking could increase the risk of AD^{18–21}. A detailed risk assessment study concluded that ~14% of AD cases are potentially attributable to smoking, and thus a 25% reduction in smoking frequency could potentially lower AD prevalence by many hundred thousand cases worldwide³. Moreover, histopathological studies showed that smokers have more severe neuropathological alterations than those who have never smoked, including neurofibrillary changes and neuritic plaques^{22,23}. To explain the discrepancy in the results, it was proposed that the deleterious effect of smoking on AD may have been masked by the fact that subjects who would have subsequently developed AD had either died or left the study due to other co-morbidities^{24,25}. From the mechanistic viewpoint, it has been reported that nicotine exacerbates tau phosphorylation both in mouse and rat models of AD^{26,27}. In addition, it has also been described that smoking can directly induce cognitive impairment^{28,29}.

In the present study, we investigated the effects of smoking on amyloid burden, inflammatory response, tau phosphorylation and neurodegeneration in the hippocampus and cortical area in a double-transgenic mouse model of AD. We found that smoking exacerbates Alzheimer's-like pathology in this *in vivo* model of AD.

Results

Cigarette smoke in APP/PS1 increases blood cotinine levels. APP/PS1 transgenic mice were exposed to both mainstream (smoke inhaled by an active smoker) and sidestream smoke (smoke from the burning end of a cigarette) in a non-ventilated exposure chamber, using a peristaltic pump that sucked the smoke from the cigarette with an airflow rate of 80 ml min⁻¹ (Fig. 1). Smoke from a commercially available cigarette was administered 5 days per week in two different doses for 4 months. Treatment started when the animals were 3 months of age and they were

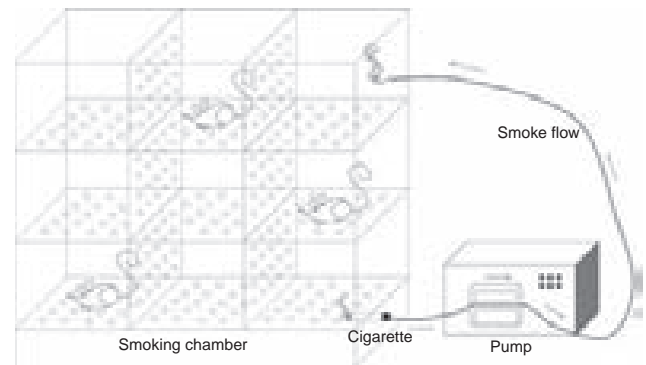


Figure 1 | Diagram of the smoking chamber and smoke flow. A peristaltic pump was used to suck the smoke from the cigarette and redirect it into the chamber again. Both mainstream and sidestream smoke was put into the chamber. The smoking chamber has nine compartments connected by holed panels. During the treatment, the animals were rotated for a more homogeneous cigarette-smoke exposure. No animals were placed on the compartments that directly received the smoke (either from the cigarette or from the pump). Control animals were exposed only to room air in a similar chamber.

sacrificed at the age of 7 months for analysis. The high-dose group received the smoke of one cigarette during 60 min, whereas low dose group received half of a cigarette during 30 min. Control transgenic animals were exposed to room air only. To measure the amount of smoke taken by the mice, we analysed the levels of cotinine in plasma during the treatment. Cotinine, the primary metabolite of nicotine, is used as a biomarker for cigarette smokers and those exposed to environmental tobacco smoke due to its longer half-life compared with that of nicotine³⁰. In passive smokers, cotinine level in plasma is ~4.4 ng ml⁻¹, whereas for active smokers, it is >10 ng ml⁻¹ (ref. 31), even after the administration of low-nicotine cigarettes³². Cotinine levels in plasma could reach up to 500 ng ml⁻¹ in heavy smokers. As cotinine is completely cleared from the system after 3 days of smoke exposure, we quantified cotinine levels in plasma after 1, 2 and 3 days of treatment in low-dose and high-dose groups to check the exposure level to tobacco smoke (Fig. 2). The high dose group reaches the cotinine levels of a light active smoker (>10 ng ml⁻¹) 3 days after starting smoke administration, whereas the low dose group displays a cotinine concentration of <5 ng ml⁻¹ (Fig. 2). These cotinine values suggest that mice receiving low dose of cigarette smoke uptake a similar amount of smoke as passive smokers, whereas mice treated under the high dose of cigarette smoke receive a similar exposure as light active smokers.

Cigarette smoking exacerbates amyloid load and plaque density. Amyloid beta ($A\beta$) extracellular accumulation is one of the main neuropathological features of AD. To determine whether smoking affects $A\beta$ deposition, we analysed $A\beta$ burden, density and size of amyloid deposits in 7-month-old control transgenic animals and those treated with different doses of cigarette smoke. We focused on the hippocampus and cortex because these regions are the most affected by amyloid deposition in AD in both humans and transgenic animals. Histological analysis of immunostained slides with a specific antibody against $A\beta$ (4G8, which recognizes amino acid residues 17–24 of $A\beta$) was performed in exposed and unexposed mice (Fig. 3). APP/PS1 animals start to develop amyloid plaques around 5–6 months-old^{33,34}. At 7 months of age, the control animals and those exposed to a low dose of cigarette smoke, display a small amount of $A\beta$ plaques

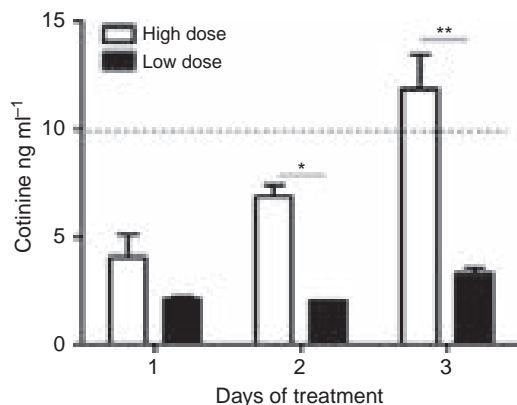


Figure 2 | Mice exposed to high dose of cigarette smoke contain comparable amounts of cotinine in serum as light active smokers.

The level of cotinine in blood provides a direct quantification of the nicotine intake and is thus, a valuable indicator of tobacco smoke exposure³¹. Low-dose-treated animals showed a low cotinine blood level, which is in the range observed for passive smokers ($<10 \text{ ng ml}^{-1}$); whereas in high-dose-treated animals, cotinine blood levels were similar to light active smokers ($>10 \text{ ng ml}^{-1}$). The significance of the differences was evaluated by two-way ANOVA, followed by individual comparison using Bonferroni post test. Data are shown as mean (\pm s.e.m.). $n = 3$ animals/group; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

in cortical (Fig. 3a) and hippocampal (Fig. 3b) regions. Quantification of A β burden, expressed as percentage of stained area per total area analysed, showed a significant increase ($>33\%$) in amyloid load in high-dose-treated animals compared with the low-dose group or the control unexposed animals in the cerebral cortex ($n = 5\text{--}6$ animals/group, four sections per animal; $P = 0.016$ by one-way ANOVA; $P < 0.05$ by *post-hoc* Tukey's multiple comparisons test) (Fig. 3c). However, despite a trend, amyloid burden was not significantly increased in the hippocampal region by smoke exposure (Fig. 3d). The increase of amyloid load could be related with an increase in the number of plaques, the size of the amyloid deposits, or both. To address this question, we next quantified the density of amyloid plaques and expressed this measurement as the number of amyloid plaques per mm^2 . In this case, we found significant differences in plaque density in both cortex (Fig. 3e) and hippocampus (Fig. 3f) ($+39.7\%$ and $+48.6\%$, respectively). These results indicate that smoke exposure exacerbates the pathology by increasing the amount of amyloid plaques, possibly by promoting the formation of new plaques. To further investigate this issue, we studied the size distribution of amyloid deposits, classifying them into four different size ranges: plaques $<200 \mu\text{m}^2$, $200\text{--}500 \mu\text{m}^2$, $500\text{--}1,000 \mu\text{m}^2$ and $>1,000 \mu\text{m}^2$. In both cortex (Fig. 3g) and hippocampus (Fig. 3h), we observed a significant increase in the number of small plaques ($+53.0\%$ and $+60.5\%$ respectively) in the high-dose group compared with that in the low-dose and control groups ($n = 5\text{--}6$ animals/group, four sections per animal; $P = 0.035$ by two-way ANOVA; $P < 0.05$ and $P < 0.01$ by *post-hoc* test, respectively). This result suggests that the primary effect of tobacco smoke on amyloid is to promote the formation of new A β deposits.

To evaluate the influence of smoking in the formation of fibrillar amyloid deposits, Thioflavin-S (ThS) staining was done in sections corresponding to the cortical area (Fig. 4a), hippocampus (Fig. 4b) and subiculum (Fig. 4c). Quantification of ThS-positive fibrillar amyloid shows that high-dose-treated animals display a larger amount of these structures in both cortex ($+58.1\%$)

and hippocampus ($+103.0\%$) (Fig. 4d and e) compared with low-dose-treated animals and controls ($n = 5\text{--}6$ animals/group, four sections per animal; $P = 0.021$ and $P = 0.041$ respectively by one-way ANOVA; $P < 0.05$ by *post-hoc* test). However, the ThS-positive amyloid burden in the subicular area was not significantly different among groups after smoke exposure (Fig. 4f). These results indicate that smoking can also enhance the maturation of amyloid plaques. Alternatively, it is also possible that smoking can stimulate the earlier deposition of plaques, giving them more time to mature. Therefore, exposure to high-dose cigarette smoke induces an increase in the number, burden and maturation of amyloid plaques in hippocampus and cortex. No significant effect on any of these parameters was observed when the animals were subjected to low doses of cigarette smoke, comparable to those received by passive smokers.

Enhancement of neuroinflammation by cigarette smoking.

Another important hallmark of AD pathology is a chronic inflammatory response in the brain associated with amyloid deposition. This neuroinflammatory process manifests as an increase of reactive astrocytes and activated microglia³⁵. To determine the effect of cigarette smoke in AD-associated microglial activation, we immunostained microglial cells using Iba1 antibody (Fig. 5a-d) and quantified the labelled area in relation to the total area analysed. Iba1 is a protein specifically expressed in microglial cells with macrophage activity and is upregulated during their activation³⁶. As noticed in the representative pictures, both cortex (Fig. 5a) and hippocampus (Fig. 5b) display lower Iba1-immunoreactivity in control animals and low-dose-treated animals compared with the high dose group. Activated microglial cells in the control group (arrow in Fig. 5c) are scattered and less abundant than in the high-dose group, where enlargement of the cell body and swelling of microglial processes is highly prominent (arrows in Fig. 5d). Most of the microglial cells are arranged in clusters, probably surrounding the plaques. The densitometric analysis of light microscopic images showed an enhanced microglial activation in high-dose-treated animals compared with low-dose and control groups in both cortex ($+50.0\%$) and hippocampus ($+85.7\%$) ($n = 5\text{--}6$ animals/group, four sections per animal; $P = 0.032$ and $P = 0.028$ respectively by one-way ANOVA; $P < 0.05$ by *post-hoc* test) (Fig. 5e and f). To evaluate whether microglial activation was due to amyloid deposition, we analysed the correlation between microglial and amyloid staining in all the studied groups. The Pearson correlation coefficient value was 0.72 ($P < 0.0001$), indicating a significant positive correlation between amyloid burden and microglial activation.

We also wanted to determine the effect of cigarette smoke exposure in astrogliosis. Astroglial cells were immunostained using GFAP antibody (Fig. 6a-d), which recognizes an intermediate filament protein (glial fibrillary acidic protein) expressed mainly in astrocytes. GFAP immunostaining was highly increased in the high-dose-exposed group compared with that in the control and low dose groups, as shown in representative pictures of the cortical (Fig. 6a) and hippocampal (Fig. 6b) areas. Higher magnification of reactive astrocytes in the cortex is shown for the control (Fig. 6c) and high-dose group (Fig. 6d). Numerous reactive astrocytes with cell body hypertrophy and thickened processes were seen in the high-dose-treated group (arrows in Fig. 6d) compared with that in the control group. Results of densitometric analysis showed a significant increase in the area occupied by reactive astrocytes in cortex ($+105.0\%$) and hippocampus ($+71.1\%$) of high-dose-treated animals compared with low-dose and control animals (Fig. 6e and f) ($n = 5\text{--}6$ animals/group, four sections per animal;

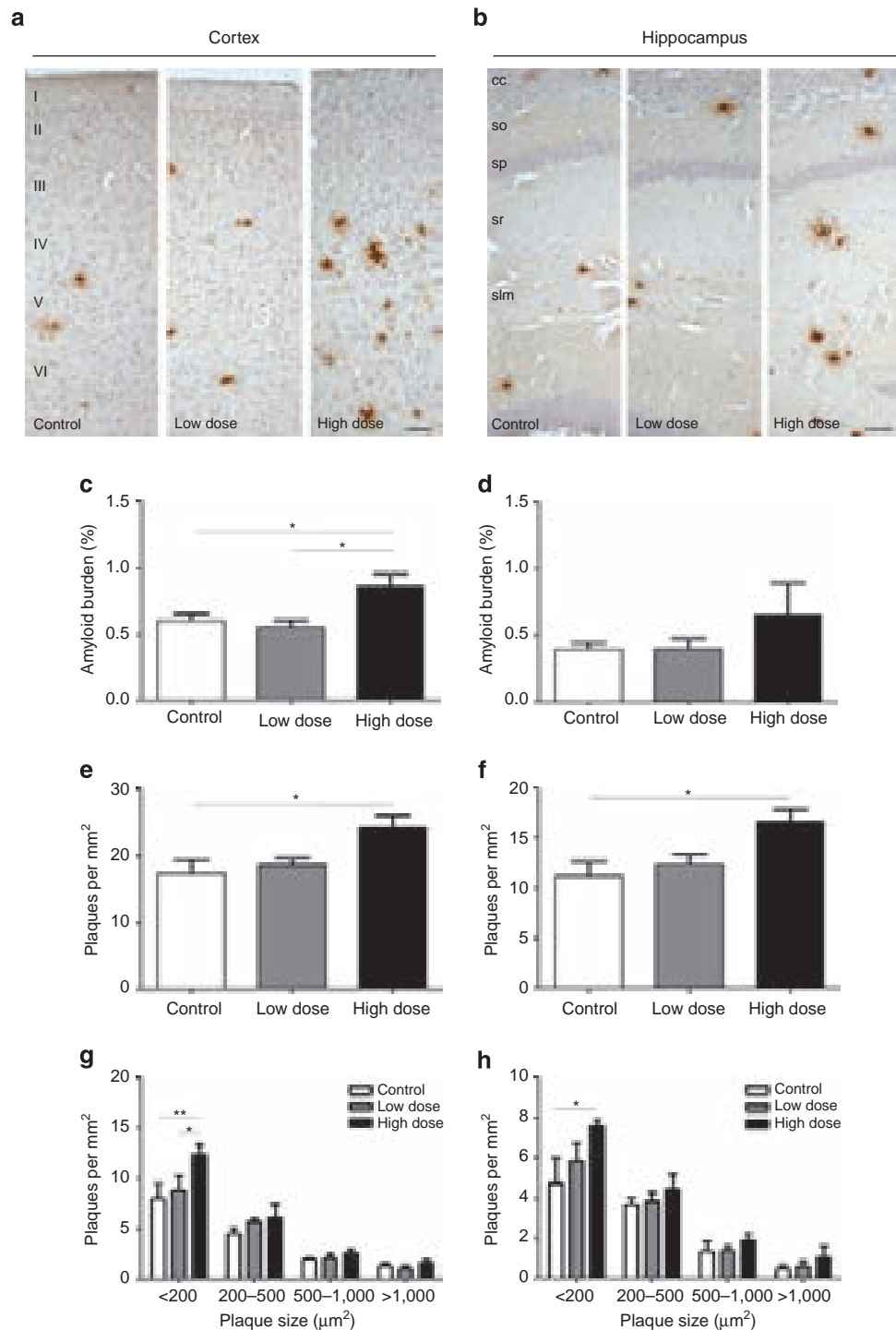


Figure 3 | Smoking significantly increases A β load and amyloid plaque density in animals exposed to high-dose cigarette smoke. Light microscopic images of 4G8-immunoreactivity counterstained with hematoxylin in cortex (**a**) and hippocampus (**b**) of control, low-dose and high-dose cigarette smoke-treated mice. Image analysis was done to estimate the amyloid burden in cortex (**c**) and hippocampus (**d**), which is expressed as the percentage of the area reactive with anti-A β antibody in relation to the total area analysed. The amyloid plaque density (number of plaques per area) was also calculated in both cortex (**e**) and hippocampus (**f**). The size distribution of plaques in cortex (**g**) and hippocampus (**h**) was determined to investigate whether smoke exposure has a differential effect on plaque formation or growth. I–VI: cortical layers; cc: corpus callosum; so: stratum oriens; sp: stratum pyramidale; sr: stratum radiatum; slm: stratum lacunosum moleculare. Data (mean \pm s.e.m.) was analysed by one-way (**c–f**) or two-way (**g–h**) ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons post test. Significance (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$) was indicated in the figure. $n = 5$ – 6 animals/group, four sections per animal. Scale bar: 50 μm .

$P = 0.014$ and $P = 0.009$ respectively by one-way ANOVA; $P < 0.05$ by *post-hoc* tests). The correlation between astroglial immunostaining and amyloid deposition was determined by linear regression. The Pearson correlation coefficient value was

0.67 ($P < 0.0001$), indicating a significant positive correlation between the two variables including all studied groups. These results indicate that animals exposed to high doses of tobacco smoke exhibit a higher inflammatory response in hippocampus

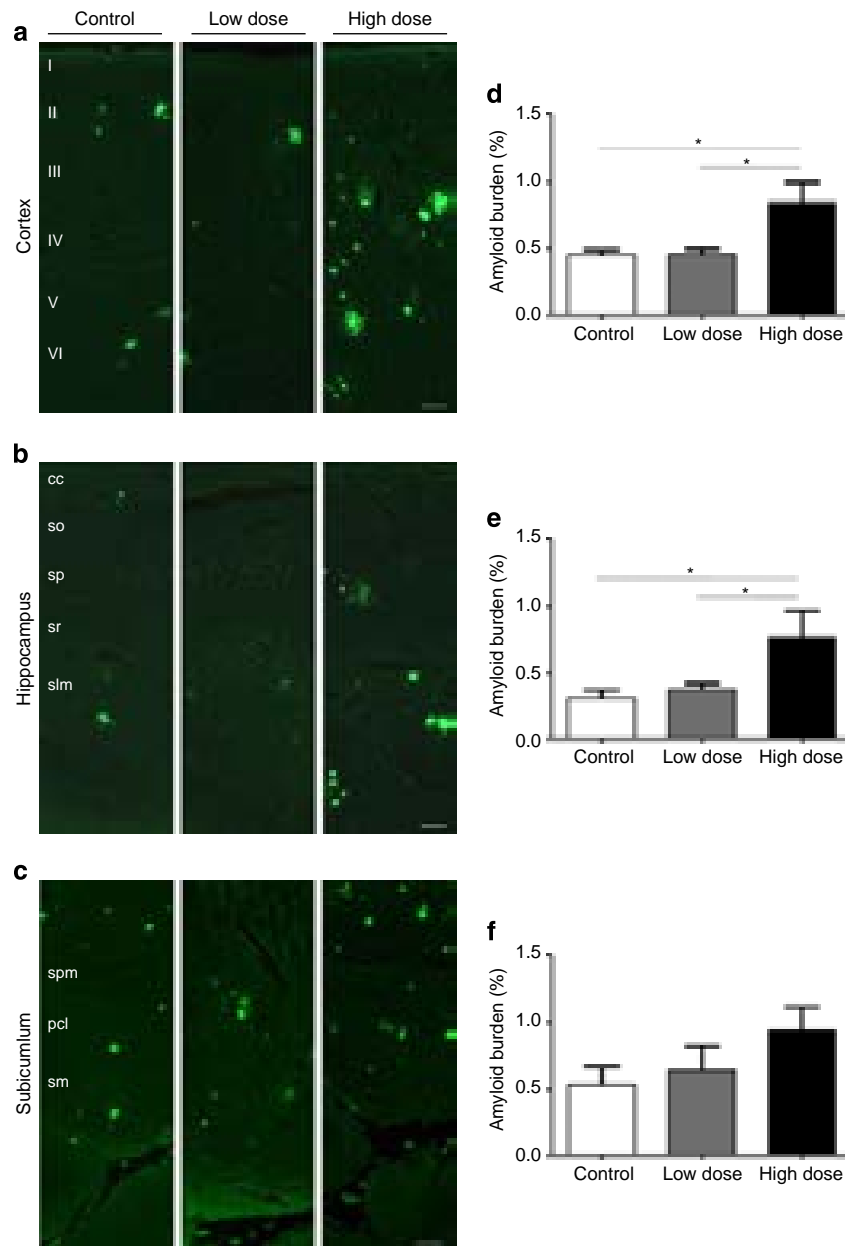


Figure 4 | Fibrillar A β load is significantly increased in high-dose smoke treated-animals. Epifluorescent microscopic images of ThS staining shown in cortex (a), hippocampus (b), and subiculum (c) of control, low-dose and high-dose cigarette smoke-treated mice. The burden of ThS-positive amyloid plaques was increased in high-dose-treated mice in both cortical areas (d) and hippocampus (e) compared with control and low-dose age-matched mice. However, no significant changes were observed in the subicular area (f). I–VI: cortical layers; cc: corpus callosum; so: stratum oriens; sp: stratum pyramidale; sr: stratum radiatum; slm: stratum lacunosum molecular; spm: stratum polymorphic; pcl: pyramidal cell layer; sm: stratum moleculare. Data (mean \pm s.e.m.) was analysed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test ($n = 5$ – 6 animals/group, four sections per animal). Scale bar: 50 μ m. * $P < 0.05$.

and cortex, and that this neuroinflammatory process is likely the result of higher amyloid deposition induced by smoking.

Tau phosphorylation is increased in smoke-treated animals. It is well known that the presence of amyloid deposits produces an increase in cellular oxidative stress, which leads to a dysregulation in the activity of serine/threonine kinases, among others³⁷. These kinases are involved in tau phosphorylation, inducing its hyperphosphorylation, which presumably leads to tangle formation³⁸. To determine whether smoke exposure modulates tau phosphorylation, we analysed tau hyperphosphorylation by

using a phospho-specific anti-tau antibody, AT8, which recognizes phosphorylation in Ser-202 and Thr-205 (ref. 39), costained with ThS to label amyloid plaques (Fig. 7). Representative pictures of cortical plaques are shown. Whereas in non-treated animals, no significant AT8-positive staining was found (Fig. 7a); small punctuated AT8-positive staining, similar to dystrophic neurites, appear in the low- and high-dose groups both in cortex and hippocampal areas, mainly surrounding amyloid plaques (Fig. 7b and c). Although the low dose group demonstrated very little AT8-immunoreactivity (arrow in Fig. 7b2), AT8-positive staining was evident in high-dose-treated animals, exhibiting tau hyperphosphorylation

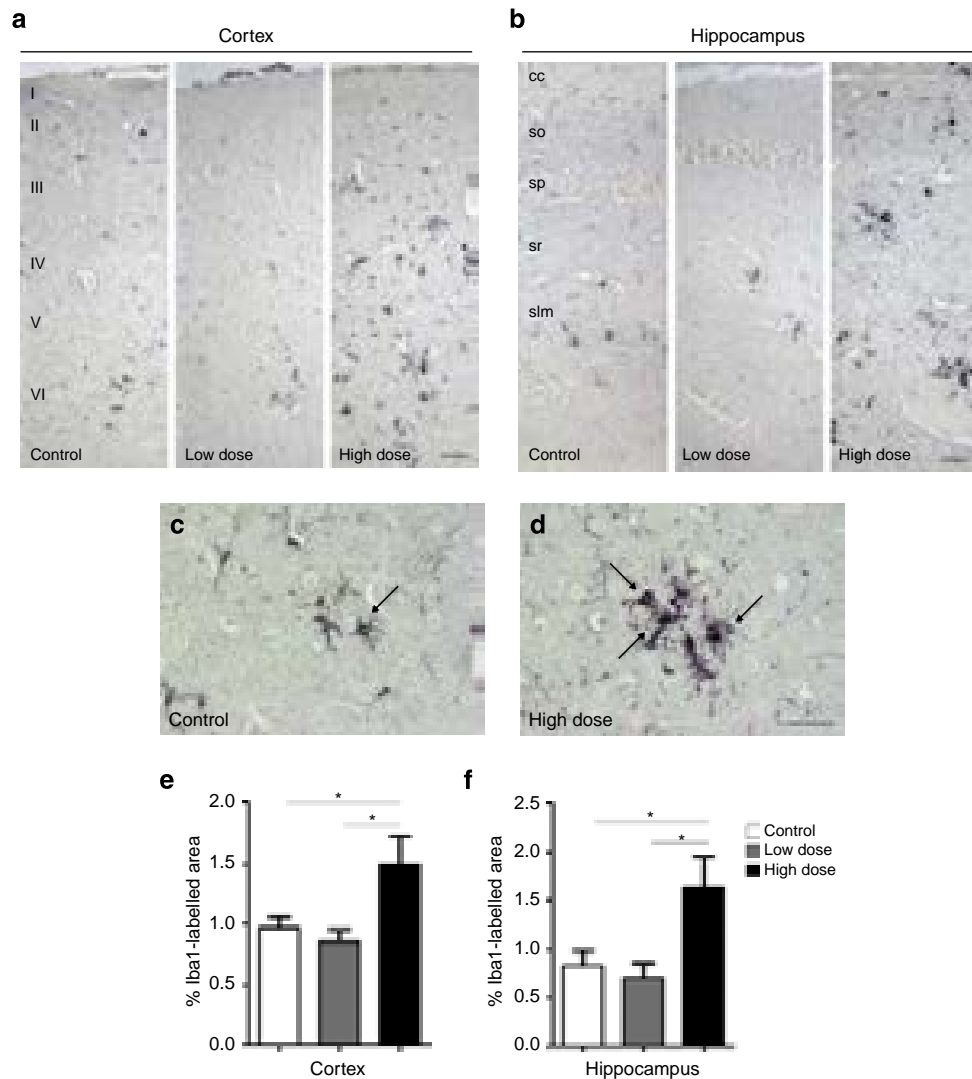


Figure 5 | Microglial activation is significantly increased in high-dose smoke-treated animals. Light microscopic images of Iba1-immunoreactivity (specific for microglial cells) shown in cortex (**a**) and hippocampus (**b**) of control, low-dose and high-dose cigarette smoke-treated mice. Higher magnification images of Iba1-staining show the increased number of hypertrophied activated microglial cells (arrows in **d**) that appear in the cortex of the high-dose-treated animals compared with the control group (**c**). Activated microglial cells were statistically increased in high-dose-treated mice in both cortical (**e**) and hippocampal (**f**) areas compared with low-dose and untreated age-matched mice. I–VI: cortical layers; cc: corpus callosum; so: stratum oriens; sp: stratum pyramidale; sr: stratum radiatum; slm: stratum lacunosum moleculare. Data (mean \pm s.e.m.) was analysed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. $n = 5$ – 6 animals/group, four sections per animal. Scale bar: $50 \mu\text{m}$ (**a–b**), $25 \mu\text{m}$ (**c–d**). $*P < 0.05$.

surrounding most of the amyloid plaques (arrows in Fig. 7c2). At this point, we cannot determine if this increase in tau phosphorylation is due to a direct effect of smoking treatment or due to the higher amount of amyloid plaques. It is important to highlight that the observed tau alterations are far from the neuritic tau pathology seen in AD brain. However, it is widely known in the field that *bona-fide* tau pathology is not seen in mice, unless animals express human mutant tau.

Neurodegeneration is not affected by cigarette smoke. Neuronal death is a common feature during aging and in neurodegenerative diseases, such as AD. Several transgenic models of AD recapitulate some of the neuropathological alterations observed in AD patients, but they scarcely show any evidence of neuronal death⁴⁰. To evaluate whether neurodegeneration is also enhanced by exposure to cigarette smoke, we analysed neuronal loss by quantifying the number of neurons in cortex, hippocampus and

subiculum after staining with NeuN antibody, which recognizes a neuron-specific protein in mature neurons (Fig. 8a–c). No significant differences were found in neuronal density among the three groups in the cortical area (Fig. 8d), CA1–CA3 hippocampal areas (Fig. 8e) or subiculum (Fig. 8f). The lack of differences in neurodegeneration among the groups was also confirmed by Fluoro-Jade C staining, which labels specifically degenerating neurons (data not shown). Nevertheless, it is still possible that some particular subsets of neurons could be specifically vulnerable to cigarette-smoke exposure.

Discussion

Sporadic, late-onset AD is the most common form of the disease, which is likely associated with a complex set of environmental and genetic risk factors. Based on epidemiological studies and *in vitro* and *in vivo* experiments with nicotine administration, it was initially proposed that smoking might be protective against

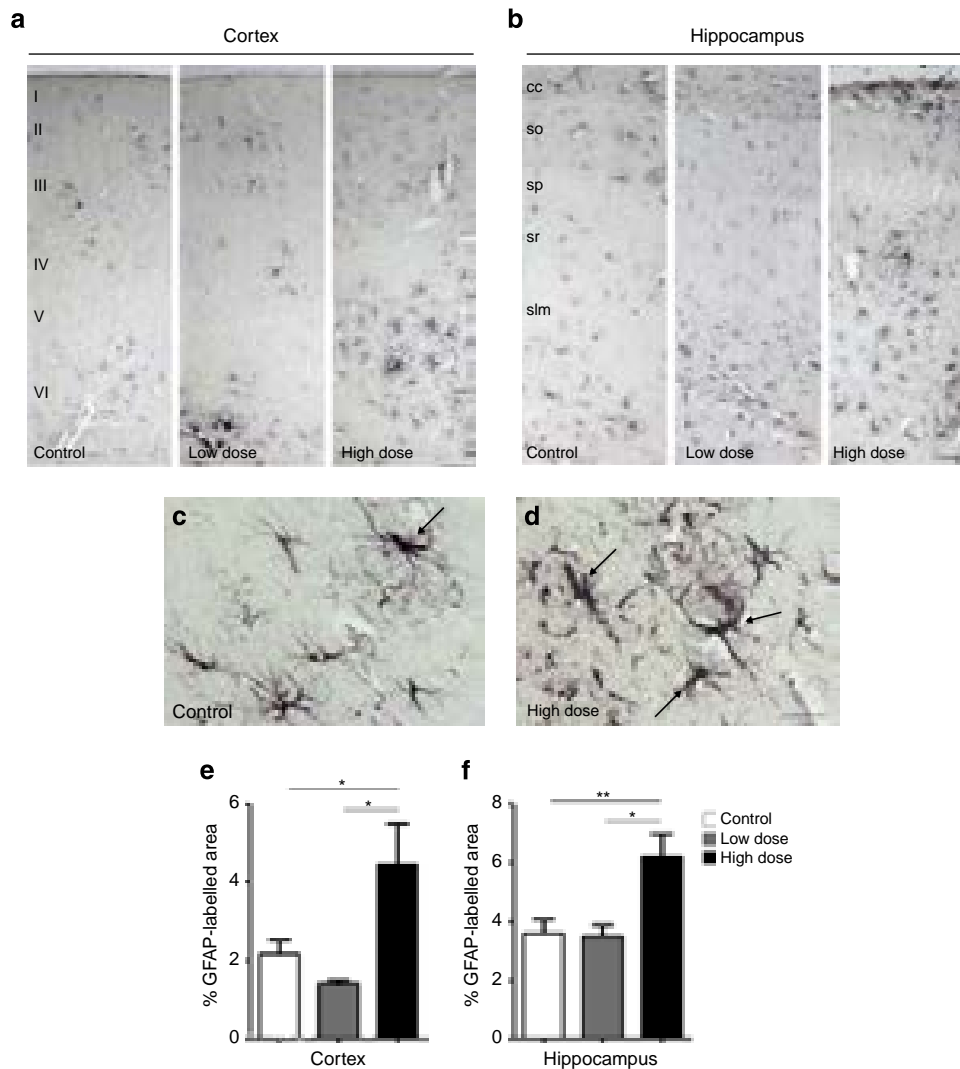


Figure 6 | Reactive astrogliosis is augmented in high-dose smoke-treated animals. Light microscopic images of GFAP-immunoreactivity (specific for astroglial cells) shown in cortex (**a**) and hippocampus (**b**) of control, low-dose and high-dose cigarette smoke-treated mice. High magnification images of GFAP-stained reactive astroglial cells (arrows) in the cortical area of control (**c**) and high-dose groups (**d**). Immunostained astrocytes were increased in high-dose-treated mice in both cortical area (**e**) and hippocampus (**f**) compared with control and low-dose age-matched mice. I–VI: cortical layers; cc: corpus callosum; so: stratum oriens; sp: stratum pyramidale; sr: stratum radiatum; slm: stratum lacunosum moleculare. Data (mean \pm s.e.m.) was analysed by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. $n = 5$ –6 animals/group, four sections per animal. Scale bar: 50 μ m (**a–b**), 25 μ m (**c–d**). ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

AD^{6,7,12–14}. However, more recent and complete demographic studies have shown that smoking represents one of the largest risk factors for AD^{3,19–22}. To study the effect of cigarette smoking on the onset of brain alterations typical of AD, we exposed mice, genetically engineered to develop some of the neuropathological features of AD, to complete tobacco smoke, under similar conditions in which smokers are exposed to this material. Double transgenic APP/PS1 mice expressing two of the human genes associated with AD were exposed to different doses of cigarette smoke, 5 days per week, during 4 consecutive months. The pathological features of AD were measured and compared with the untreated control counterparts. Our results suggest that smoking increases amyloid deposition in a dose-dependent manner, by promoting the formation of new plaques and contributing to the maturation of amyloid deposits. Smoking also exacerbates gliosis, inducing microglial activation and reactive astrogliosis in the mice exposed to high doses of smoke. Neuroinflammatory response was exacerbated after smoke exposure and correlated with the increase of amyloid

lesions. Exposure to smoke also induced alterations in tau phosphorylation around the amyloid plaques, which are considered a precursor of tangle formation. However, we could not find a decrease in neuronal density in smoke-exposed animals. Our findings provide direct evidence that cigarette smoking exacerbates some of the typical neuropathological alterations associated with AD *in vivo*. The mechanisms by which smoking increases the risk of AD abnormalities remain unclear. There are several possible pathways by which smoking may have this deleterious effect, including direct induction of protein misfolding and aggregation due to some of the smoking components, increase of oxidative stress, impairments of the proteostasis machinery, cerebrovascular damage, brain inflammation and so on. Further studies are needed to elucidate which of these different mechanisms operate and whether the same effect is also observed in humans. Our results suggest that cigarette smoking may contribute to the accumulation of cerebral protein aggregates and, thus, may constitute an important environmental risk factor for AD and other protein misfolding diseases.

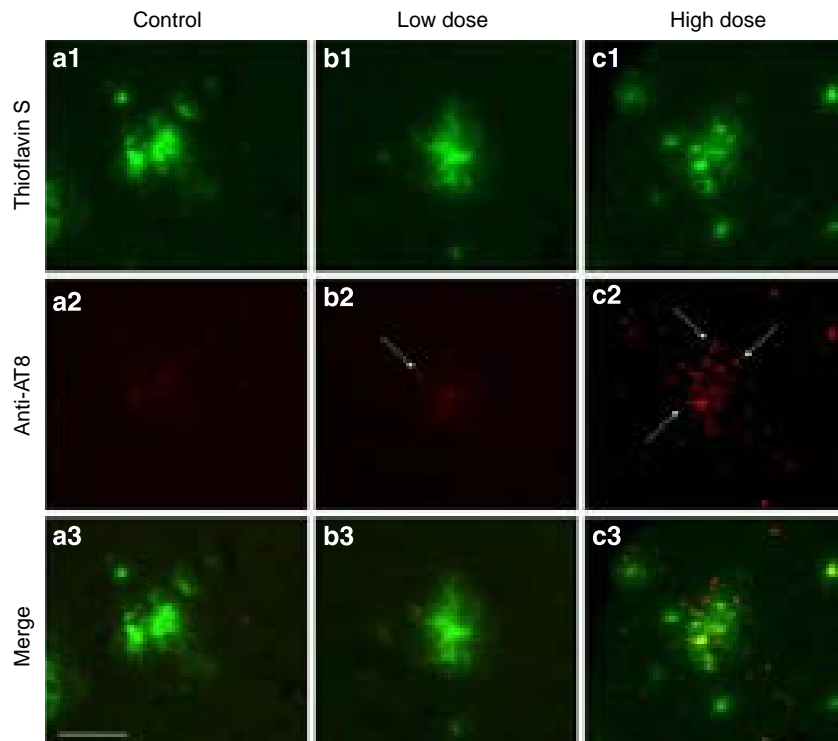


Figure 7 | Abnormally phosphorylated tau is enhanced in smoke-treated animals. Representative epifluorescent microscopic images of ThS staining (green) and anti-AT8 phosphorylated tau antibody (red) seen in control (**a1–a3**), low-dose (**b1–b3**) and high-dose (**c1–c3**) cigarette smoke-treated mice in the motor cortex. High-dose smoking induces tau hyperphosphorylation (arrows in **c2**) compared with control and low-dose age-matched mice, in which little or no AT8-positive staining was found. Abnormally phosphorylated tau accumulates mainly around amyloid plaques (**c3**). Scale bar: 25 μm .

Methods

Transgenic mice. APP^{swe}/PS1^{dE9} (B6C3-Tg (APP^{swe}, PSEN1^{dE9}) 85Dbo/J, The Jackson Laboratory) double transgenic mice express a chimeric mouse/human amyloid precursor protein containing the Swedish mutation (Mo/HuAPP695swe) and a mutant human presenilin 1 (PS1^{dE9}) gene. The generation and initial characterization of these mice has been reported previously³⁴. APP/PS1 animals develop amyloid deposits by 5–6 months old mostly located in the hippocampus, cortex and subiculum and display behavioural impairment by 13 months of age. Animals were housed in groups of up to five in individually ventilated cages under standard conditions (22 °C, 12 h light–dark cycle) receiving food and water *ad libitum*. All animal experiments were carried out in accordance with the NIH regulations.

Cigarette smoke exposure. Two groups of male and female APP/PS1 transgenic animals ($n = 5–6/\text{group}$) were each subjected to two separate smoking exposure conditions during 4 months. Transgenic mice were subjected to both mainstream and sidestream smoke obtained from a commercial brand using a specially designed non-ventilated chamber containing a peristaltic pump that sucked the smoke from the cigarette with an airflow rate of 80 ml min⁻¹ (Fig. 1). In the high-dose treatment, transgenic mice were exposed daily (5 days per week) for 60 min to the smoke generated from one cigarette. A second group of mice received a low dose of smoke defined as 30 min in the smoking chamber containing the smoke of half a cigarette. Control animals were exposed to room air in an identical chamber. Treatment started at the age of 3 months, and animals were sacrificed at 7 months of age, when amyloid plaques started to appear in this model.

Cotinine determination in blood. Exposure to tobacco smoke can be detected by measuring nicotine metabolites (for example, cotinine) in blood, as cotinine has a longer half-life than nicotine. Cotinine plasma levels were measured by using a competitive mouse/rat cotinine ELISA kit (Calbiotech). Blood samples were obtained via tail venipuncture 1 h before, and 1, 2 and 3 days after smoke exposure (immediately after exposure). To obtain plasma samples, blood was collected in EDTA-coated tubes and centrifuged at 2,000 \times g for 20 min. Plasma was separated and stored at -80 °C until use. Proteins from the plasma fraction were loaded directly onto ELISA plates and treated according to the manufacturer's recommendations. Samples were loaded in duplicate, and absorbance was read at 450 nm on an ELISA plate reader (EL800, BioTek).

Immunohistochemistry. The mice were killed by CO₂ inhalation and perfused transcardially with PBS. Brains were removed, post-fixed into fixative solution (10% neutral buffered formalin) and embedded in paraffin. Serial sections (1 out of 10 sections) from all animal groups ($n = 5–6$ per group; four sections per stain per animal) were processed in parallel for immunostaining using the same solutions to minimize variability in staining conditions. Deparaffinized 10- μm -thick sections were used for immunohistochemical staining. After blocking the endogenous peroxidase activity with 3% H₂O₂–10% methanol in PBS, pH 7.4 for 20 min, the sections were incubated overnight at room temperature in one of the primary antibodies: mouse anti-4G8 (1:1,000 Covance); rabbit anti-Iba1 (1:1,000 Wako); rabbit anti-GFAP (1:1,000 Abcam); mouse anti-ptau (1:100 AT8, Pierce); or rabbit anti-NeuN (1:1,000 Millipore). Primary antibody was detected by incubating 1 h with the corresponding HRP-linked secondary antibody: sheep anti-mouse or donkey anti-rabbit (1:1,000 GE Healthcare). Peroxidase reaction was visualized using DAB Kit (Vector) following the manufacturer's instructions. For counterstaining, the sections were incubated in Harris hematoxylin for 1 min (Fisher). Finally, the sections were dehydrated in graded ethanol, cleared in xylene and coverslipped with DPX mounting medium and examined under a bright field microscope (DMI6000B, Leica).

Fluorescent staining. For ThS (Sigma) staining, the sections were incubated in ThS solution (0.025% in 50% ethanol) for 5 min after deparaffinization, rinsed, coverslipped with mounting medium for fluorescence (Vector) and immediately visualized using a fluorescence microscope. For double AT8/Thioflavin-S fluorescent labelling, the sections were first incubated with the primary antibody followed by Alexa594-conjugated secondary antibody. Then, the sections were washed and processed for Thioflavin-S staining and coverslipped with mounting medium for fluorescence to avoid photobleaching. Fluoro-Jade C (FJC) (Millipore) staining was done to detect degenerating neurons. The sections were deparaffinized and immersed in basic alcohol (1% sodium hydroxide in 80% ethanol) for 5 min. After rinsing in 70% ethanol and distilled water, the slides were incubated in 0.06% potassium permanganate solution for 10 min, washed and incubated for 10 min in 0.0001% FJC solution and dissolved in 0.1% acetic acid. Finally, the sections were dehydrated and covered with DPX mounting medium and examined under an epifluorescent microscope (DMI6000B, Leica).

Plaque size morphometric analysis and burden quantification. Four sagittal serial sections stained with 4G8 antibody from each group were analysed using ImageJ 1.45s software for plaque size morphometry. Burden quantification was

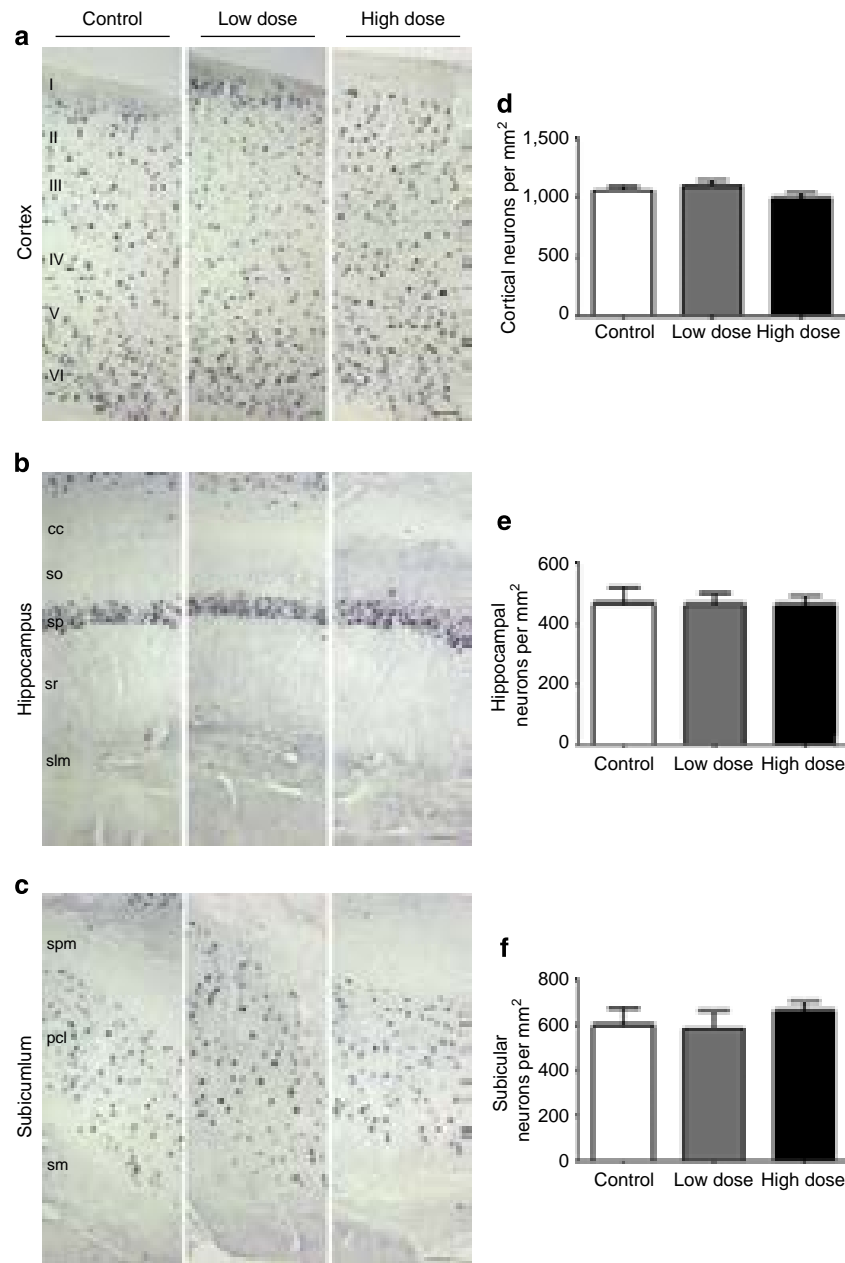


Figure 8 | Neurodegeneration is not modified by smoking exposure. Neuronal density (number of neurons per mm^2) was estimated by quantifying the number of neurons after NeuN staining (**a-c**). Neuronal density is similar in control and smoke-exposed animals ($P > 0.5$) in cortical region (**d**), CA1-CA3 hippocampal areas (**e**) and subiculum (**f**) positing that cigarette smoke does not increase the rate of neuronal death. I-VI: cortical layers; so: stratum oriens; sp: stratum pyramidale; sr: stratum radiatum; spm: stratum polymorphic; pcl: pyramidal cell layer; sm: stratum moleculare. Data (mean \pm s.e.m.) was analysed by one-way ANOVA test. $n = 5-6$ animals/group. Scale bar: $50 \mu\text{m}$.

done through the lateromedial extent of the cortical and hippocampal areas in the sagittal plane (between 0.70 and 1.60 mm lateral to the midline), being the first section of each animal randomly collected. Quantification was assessed in every tenth section (with a distance of $100 \mu\text{m}$ among them), and four $10 \mu\text{m}$ sections were measured in each animal ($n = 5-6$ /group). Brain boundaries were defined according a standard mouse stereotaxic brain atlas, and $10 \times$ objective was used for individual plaque measurement. Number of plaques per mm^2 falling into four surface categories (ranging from $< 200 \mu\text{m}^2$ to $> 2,000 \mu\text{m}^2$) was calculated. Photomicrographs were taken by using a DFC310 FX Leica digital camera (Leica), imported into ImageJ 1.45s software (NIH) and converted to black and white images. The threshold intensity was manually set and kept constant, and the number of pixels was determined for 4G8-, ThS-, Iba1- and GFAP stained sections to quantify amyloid load, fibrillar burden, microglial activation and reactive astrogliosis in hippocampal (CA1, CA2, CA3 and dentate gyrus), subiculum and cortical areas (including motor, somatosensory, visual, frontal, parietal and retrosplenial cortex). Amyloid plaque density was performed manually using

the same software by calculating the area and the number of plaques per total analysed area. Each analysis was done by a single examiner blinded to sample identities.

Neuronal density analysis. The number of NeuN-immunopositive cells was counted using a bright field microscope (DMI6000B, Leica) $20 \times$ objective. Photomicrographs were taken by using a DFC310 FX Leica digital camera and imported into ImageJ 1.45 s software (NIH). Quantification was done semi-automatically. The images were converted to black and white images, threshold intensity was set, and the number of particles was analysed by circularity. Cell counting was done through the lateromedial extent of the cortical and hippocampal areas in the sagittal plane (between 0.70 and 1.60 mm lateral to the midline), including CA1, CA2 and CA3 areas of the hippocampus, subiculum and cortical areas (motor, somatosensory, visual, frontal, parietal and retrosplenial cortex). As previously described, neurons were quantified in every tenth section, and four

10 µm sections were measured in each animal ($n = 5\text{--}6/\text{group}$). Brain boundaries were defined according a standard mouse stereotaxic brain atlas. The numerical density is expressed as neurons per mm². An investigator who was blind to the experiment performed neuronal profile counting.

Statistical analysis. Graphs are expressed as means \pm s.e.m. After confirming normal distribution with skewness and kurtosis statistic test, ANOVA followed by a *post-hoc* Tukey's multiple comparisons test were used to analyse differences among groups. For the size distribution analysis of plaques, we applied two-way ANOVA followed by Bonferroni test. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software). For linear correlation, Pearson correlation coefficient was used. Statistical differences for all tests were considered significant at the $P < 0.05$ level.

References

1. Querfurth, H. W. & LaFerla, F. M. Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* **362**, 329–344 (2010).
2. Holtzman, D. M., Goate, A., Kelly, J. & Sperling, R. Mapping the road forward in Alzheimer's disease. *Sci. Transl. Med.* **3**, 114ps48 (2011).
3. Barnes, D. E. & Yaffe, K. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol.* **10**, 819–828 (2011).
4. Flicker, L. Modifiable lifestyle risk factors for Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* **20**, 803–811 (2010).
5. Lindsay, J. *et al.* Risk factors for Alzheimer's disease: a prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *Am. J. Epidemiol.* **156**, 445–453 (2002).
6. Brenner, D. E. *et al.* Relationship between cigarette smoking and Alzheimer's disease in a population-based case-control study. *Neurology* **43**, 293–300 (1993).
7. Lee, P. N. Smoking and Alzheimer's disease: a review of the epidemiological evidence. *Neuroepidemiology* **13**, 131–144 (1994).
8. Jones, G. M., Sahakian, B. J., Levy, R., Warburton, D. M. & Gray, J. A. Effects of acute subcutaneous nicotine on attention, information processing and short-term memory in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology (Berl)* **108**, 485–494 (1992).
9. Newhouse, P. A., Potter, A. & Levin, E. D. Nicotinic system involvement in Alzheimer's and Parkinson's diseases. Implications for therapeutics. *Drugs Aging* **11**, 206–228 (1997).
10. Utsuki, T. *et al.* Nicotine lowers the secretion of the Alzheimer's amyloid beta-protein precursor that contains amyloid beta-peptide in rat. *J. Alzheimers. Dis.* **4**, 405–415 (2002).
11. Lahiri, D. K. *et al.* Nicotine reduces the secretion of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein containing beta-amyloid peptide in the rat without altering synaptic proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **965**, 364–372 (2002).
12. Salomon, A. R., Marcinowski, K. J., Friedland, R. P. & Zagorski, M. G. Nicotine inhibits amyloid formation by the beta-peptide. *Biochemistry* **35**, 13568–13578 (1996).
13. Dickerson, T. J. & Janda, K. D. A previously undescribed chemical link between smoking and metabolic disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**, 15084–15088 (2002).
14. Nordberg, A. *et al.* Chronic nicotine treatment reduces beta-amyloidosis in the brain of a mouse model of Alzheimer's disease (APPsw). *J. Neurochem.* **81**, 655–658 (2002).
15. Srivareerat, M., Tran, T. T., Salim, S., Aleisa, A. M. & Alkadhi, K. A. Chronic nicotine restores normal Abeta levels and prevents short-term memory and E-LTP impairment in Abeta rat model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **32**, 834–844 (2011).
16. Echeverria, V. *et al.* Cotinine reduces amyloid-beta aggregation and improves memory in Alzheimer's disease mice. *J. Alzheimers. Dis.* **24**, 817–835 (2011).
17. Hellstrom-Lindahl, E., Mousavi, M., Ravid, R. & Nordberg, A. Reduced levels of Abeta 40 and Abeta 42 in brains of smoking controls and Alzheimer's patients. *Neurobiol. Dis.* **15**, 351–360 (2004).
18. Ott, A. *et al.* Smoking and risk of dementia and Alzheimer's disease in a population-based cohort study: the Rotterdam Study. *Lancet* **351**, 1840–1843 (1998).
19. Reitz, C., den, H. T., van, D. C., Hofman, A. & Breteler, M. M. Relation between smoking and risk of dementia and Alzheimer disease: the Rotterdam Study. *Neurology* **69**, 998–1005 (2007).
20. Anstey, K. J., von, S. C., Salim, A. & O'Kearney, R. Smoking as a risk factor for dementia and cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies. *Am. J. Epidemiol.* **166**, 367–378 (2007).
21. Cataldo, J. K., Prochaska, J. J. & Glantz, S. A. Cigarette smoking is a risk factor for Alzheimer's Disease: an analysis controlling for tobacco industry affiliation. *J. Alzheimers. Dis.* **19**, 465–480 (2010).
22. Ulrich, J., Johansson-Locher, G., Seiler, W. O. & Stahelin, H. B. Does smoking protect from Alzheimer's disease? Alzheimer-type changes in 301 unselected brains from patients with known smoking history. *Acta Neuropathol.* **94**, 450–454 (1997).
23. Tyas, S. L. *et al.* Mid-life smoking and late-life dementia: the Honolulu-Aia Aging Study. *Neurobiol. Aging* **24**, 589–596 (2003).
24. Riggs, J. E. Smoking and Alzheimer's disease: protective effect or differential survival bias? *Lancet* **342**, 793–794 (1993).
25. Sabbagh, M. N. *et al.* Smoking affects the phenotype of Alzheimer disease. *Neurology* **64**, 1301–1303 (2005).
26. Oddo, S. *et al.* Chronic nicotine administration exacerbates tau pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 3046–3051 (2005).
27. Juan, D., Zhou, D. H., Li, J., Wang, J. Y., Gao, C. & Chen, M. A 2-year follow-up study of cigarette smoking and risk of dementia. *Eur. J. Neurol.* **11**, 277–282 (2004).
28. Richards, M., Jarvis, M. J., Thompson, N. & Wadsworth, M. E. Cigarette smoking and cognitive decline in midlife: evidence from a prospective birth cohort study. *Am. J. Public Health* **93**, 994–998 (2003).
29. Almeida, O. P., Garrido, G. J., Lautenschlager, N. T., Hulse, G. K., Jamrozik, K. & Flicker, L. Smoking is associated with reduced cortical regional gray matter density in brain regions associated with incipient Alzheimer disease. *Am. J. Geriatr. Psychiatry* **16**, 92–98 (2008).
30. Benowitz, N. L. Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol. Rev.* **18**, 188–204 (1996).
31. Seccareccia, F. *et al.* Serum cotinine as a marker of environmental tobacco smoke exposure in epidemiological studies: the experience of the MATISS project. *Eur. J. Epidemiol.* **18**, 487–492 (2003).
32. Breu-Villaca, Y. *et al.* Exposure to tobacco smoke containing either high or low levels of nicotine during adolescence: differential effects on choline uptake in the cerebral cortex and hippocampus. *Nicotine. Tob. Res.* **12**, 776–780 (2010).
33. Jankowsky, J. L., Slunt, H. H., Ratovitski, T., Jenkins, N. A., Copeland, N. G. & Borchelt, D. R. Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomol. Eng.* **17**, 157–165 (2001).
34. Garcia-Alloza, M. *et al.* Characterization of amyloid deposition in the APPsw/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol. Dis.* **24**, 516–524 (2006).
35. Tuppo, E. E. & Arias, H. R. The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 289–305 (2005).
36. Leone, C. *et al.* Characterization of human monocyte-derived microglia-like cells. *Glia* **54**, 183–192 (2006).
37. Hernandez, F. & Avila, J. The role of glycogen synthase kinase 3 in the early stages of Alzheimer's disease. *FEBS Lett.* **582**, 3848–3854 (2008).
38. Takashima, A. GSK-3 is essential in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* **9**, 309–317 (2006).
39. Goedert, M., Jakes, R. & Vanmechelen, E. Monoclonal antibody AT8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205. *Neurosci. Lett.* **189**, 167–169 (1995).
40. Games, D., Buttini, M., Kobayashi, D., Schenk, D. & Seubert, P. Mice as models: transgenic approaches and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* **9**, 133–149 (2006).

Acknowledgements

We thank Claudia Duran-Aniotz for technical assistance and statistical analysis advice and George Edwards III for critical reading of the manuscript. ESM held a PhD fellowship from Spain FPU programme. This work was partially funded by an award from the Mitchell Foundation to CS and the FONDECYT 3110052 grant to LDE.

Author contributions

IMG performed all histological staining and image analysis, ELISA quantification, analysed all data, prepared the final version of the figures and wrote the manuscript. LDE designed the experimental plan, performed the majority of smoke administration experiments, sacrificed the animals, collected the tissue and fixed them. ESM collaborated on the experiments to measure cotinine levels in blood and helped with the histological staining. CS supervised the entire project, designed the research plan, participated in data analysis and wrote the manuscript.

Additional information

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

How to cite this article: Moreno-Gonzalez, I. *et al.* Smoking exacerbates amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat. Commun.* **4**:1495 doi: 10.1038/ncomms2494 (2013).

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 PS1M146LxAPP^{Swe}-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).

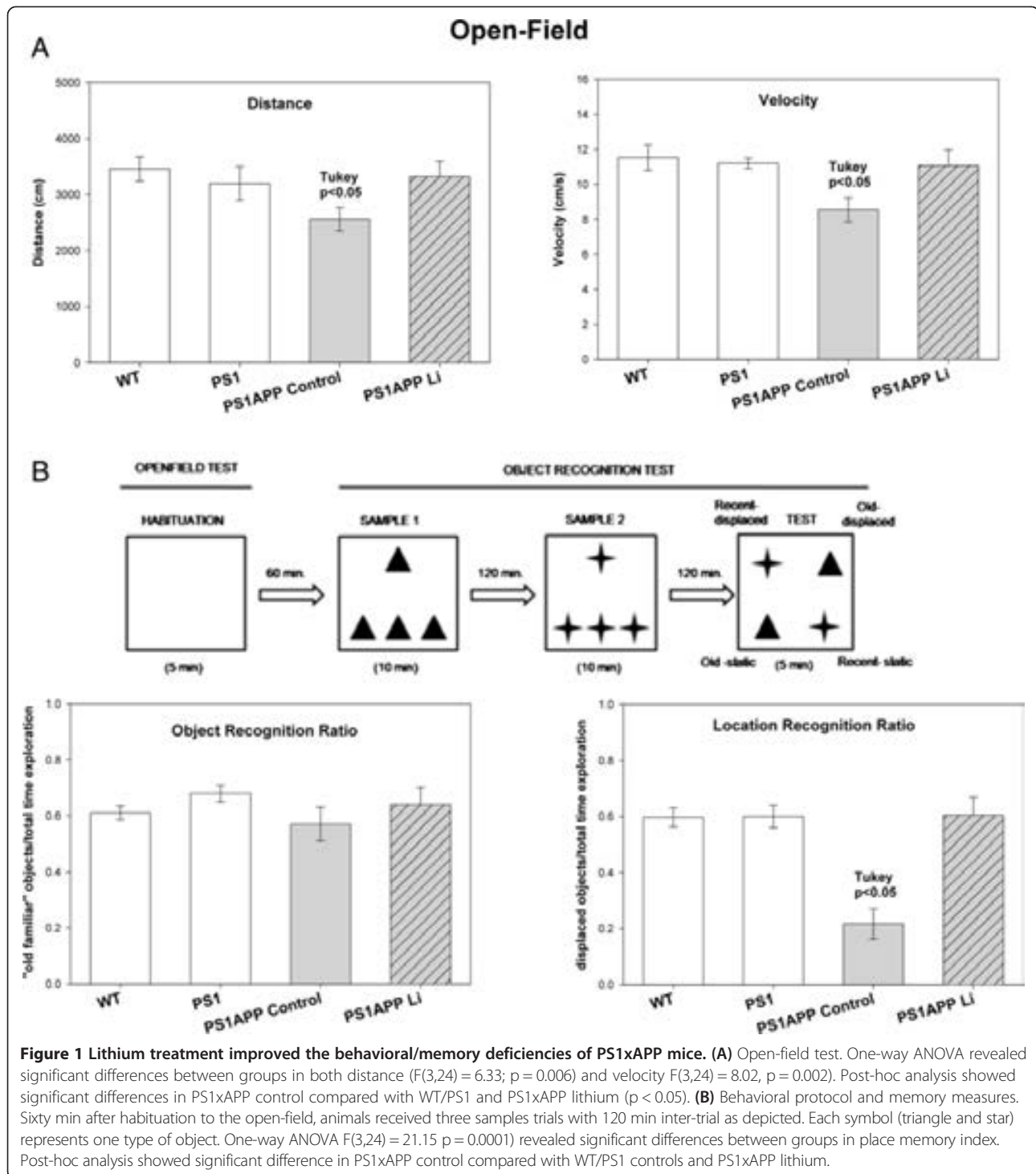
Methods

Transgenic mice and lithium treatment

Generation of PS1M146LxAPP^{751Swe}-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-APP^{751SL} mice. Only male mice were used in this work.

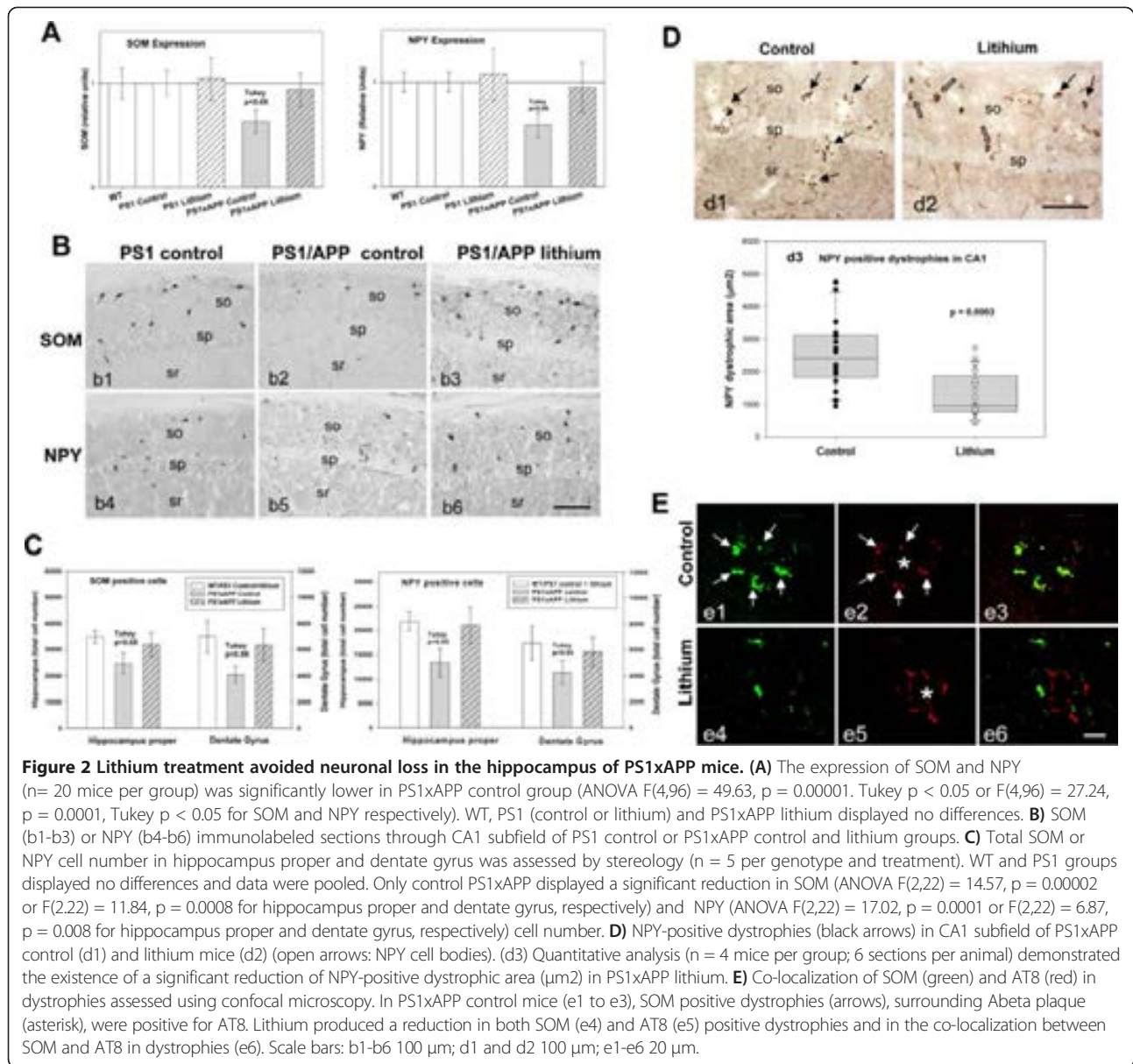
As controls, we used age-matched non-transgenic (C57BL:6) male mice (WT) or hemizygous PS1M146L littermates (PS1). The PS1 mice displayed no apparent differences with WT mice, at the age used in this work [24] (see also Figures 1 and 2A). Only PS1xAPP mice model accumulated Abeta plaques. Thus, to specifically 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 hemibrain dissected (cortex and hippocampus), frozen and stored at -80°C while the other hemibrain 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 100×/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, $N = 1/sf \times 1/asf \times 1/hsf \times \Sigma Q^-$, 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 ΣQ^- 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 $A = \Sigma Qi^2$, $B = \Sigma Qi \times Qi + 1$, $C = \Sigma Qi \times Qi + 2$. 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).

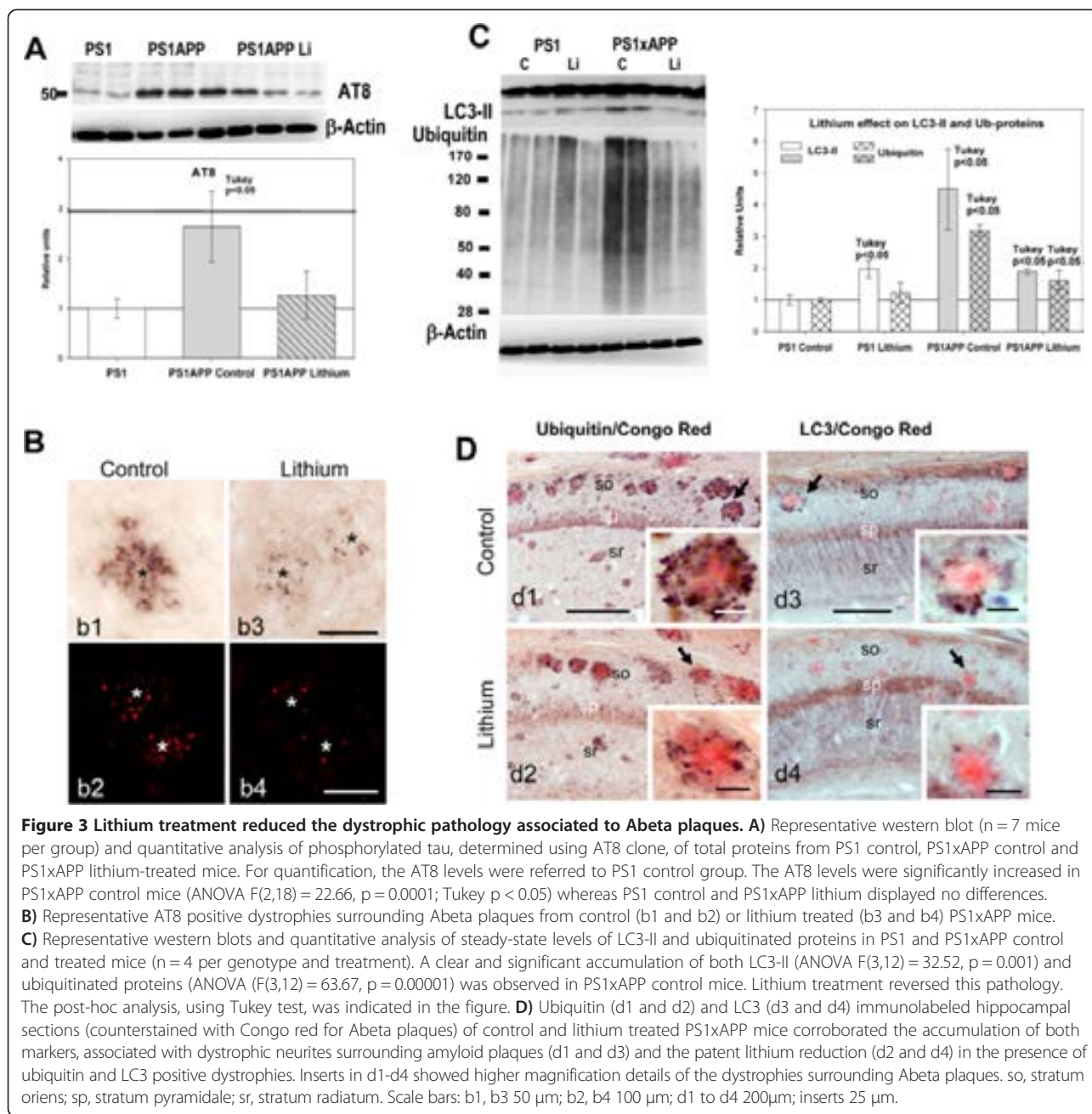
Thus, early lithium intervention was highly effective preventing the SOM/NPY neuronal loss in both the hippocampal formation and the entorhinal cortex of PS1xAPP model.

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

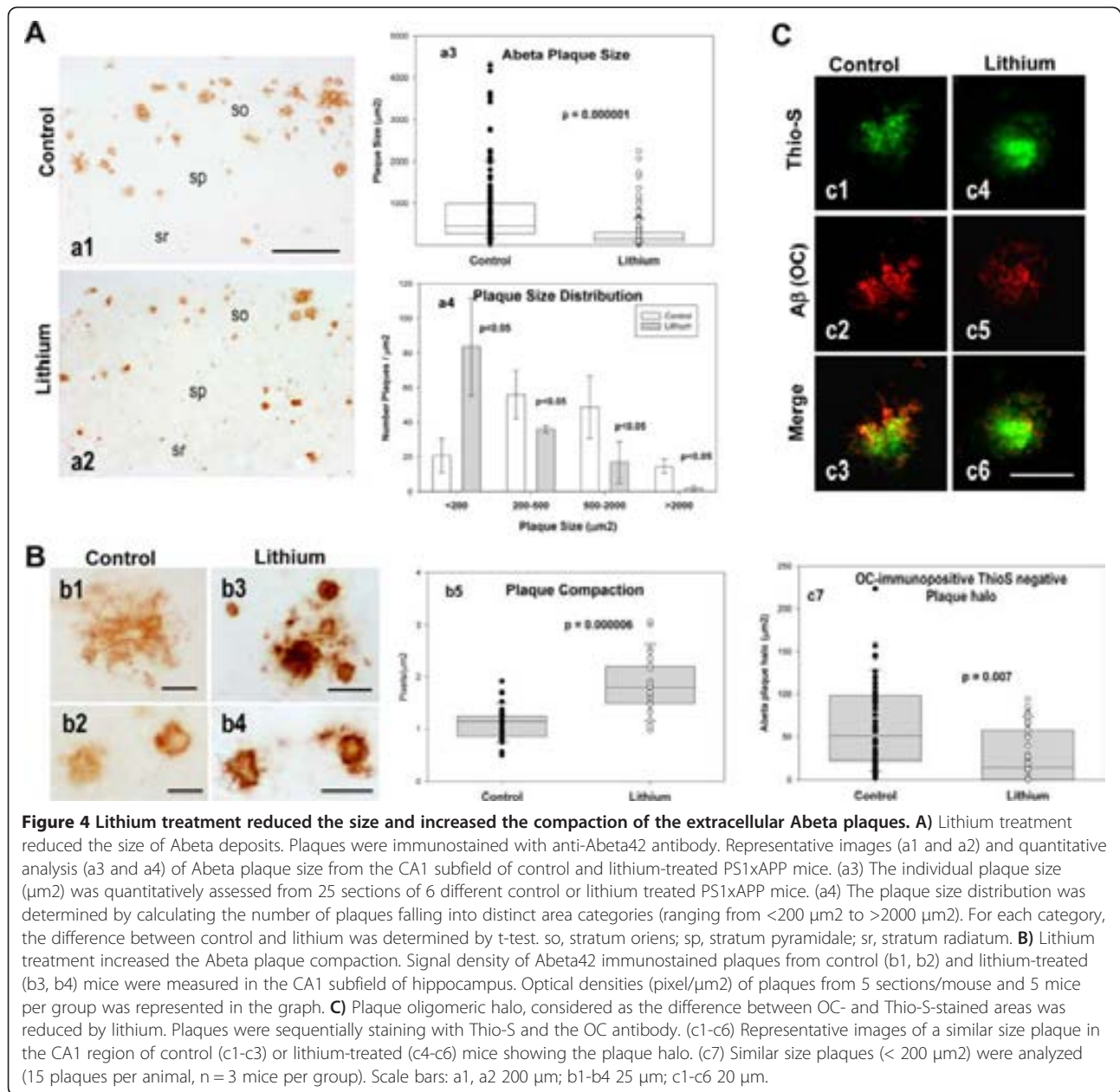
in NPY and 6E10 double immunostained sections (Figure 5A), we first calculated the proportion of Abeta plaques devoid of NPY dystrophies. As shown, treated PS1xAPP mice displayed a small, but significant, increase in the proportion of plaques without associated NPY dystrophies (Figure 5B). More relevant, 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

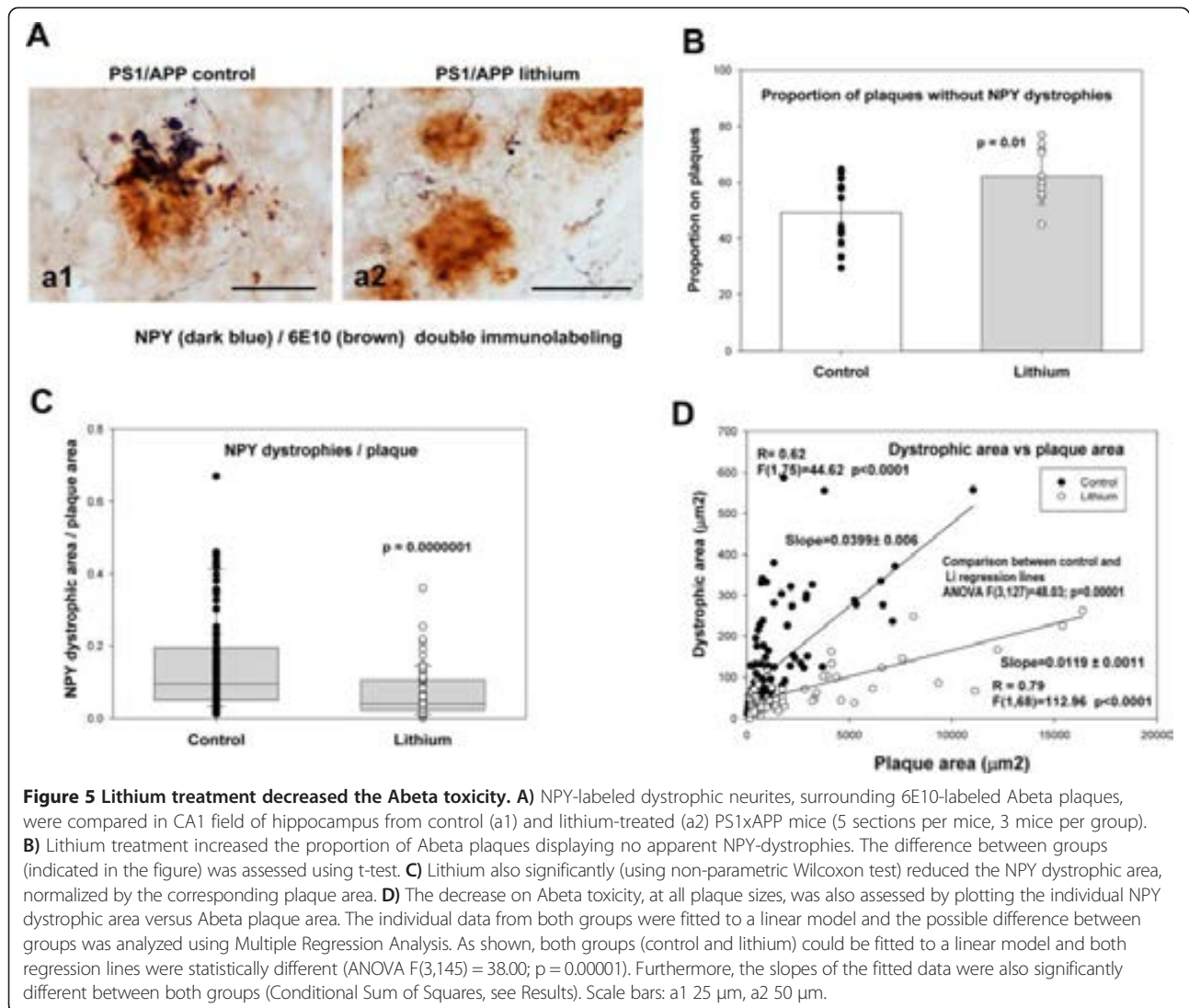
Finally, we investigated the possible implication of astrocytes on this lithium-mediated modification of Abeta plaques. Activated astrocytes, surrounding Abeta, could highly influence the Abeta compaction and plaque aggregation [35-37]. Thus, we evaluated whether lithium affected the astrocyte activation 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.

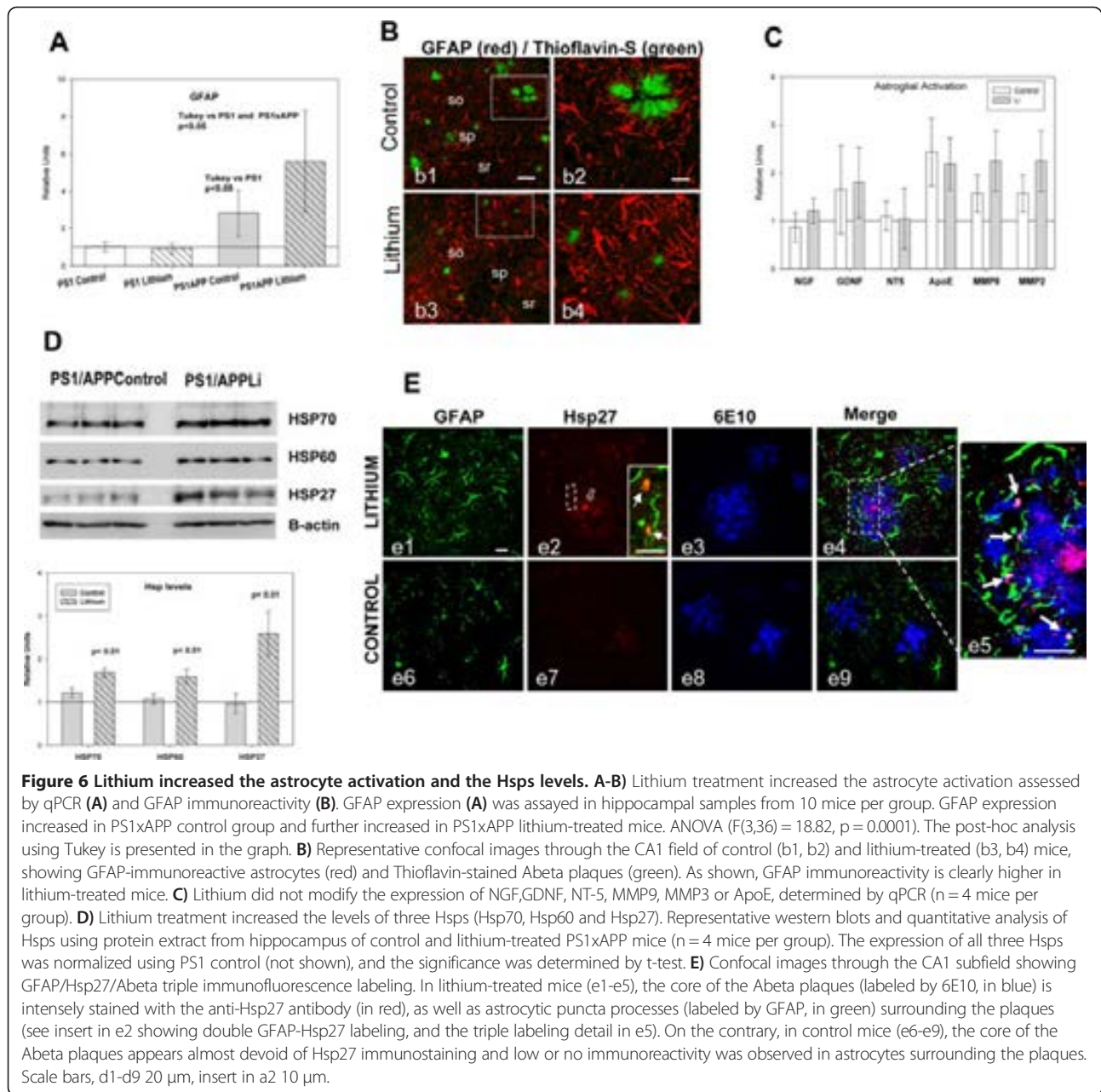
Discussion

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 APPsw/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 APPsw/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, Schtzl 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



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 Vizúete^{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: $\text{ND} = Q/(\Sigma A * h)$, 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).

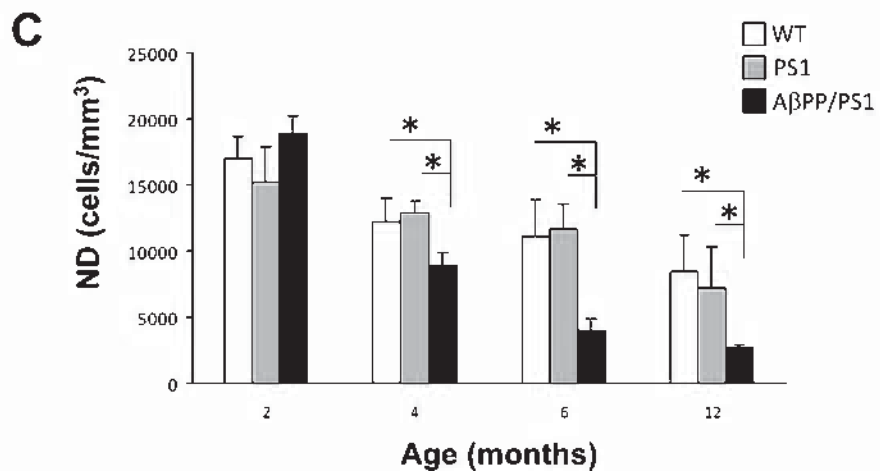
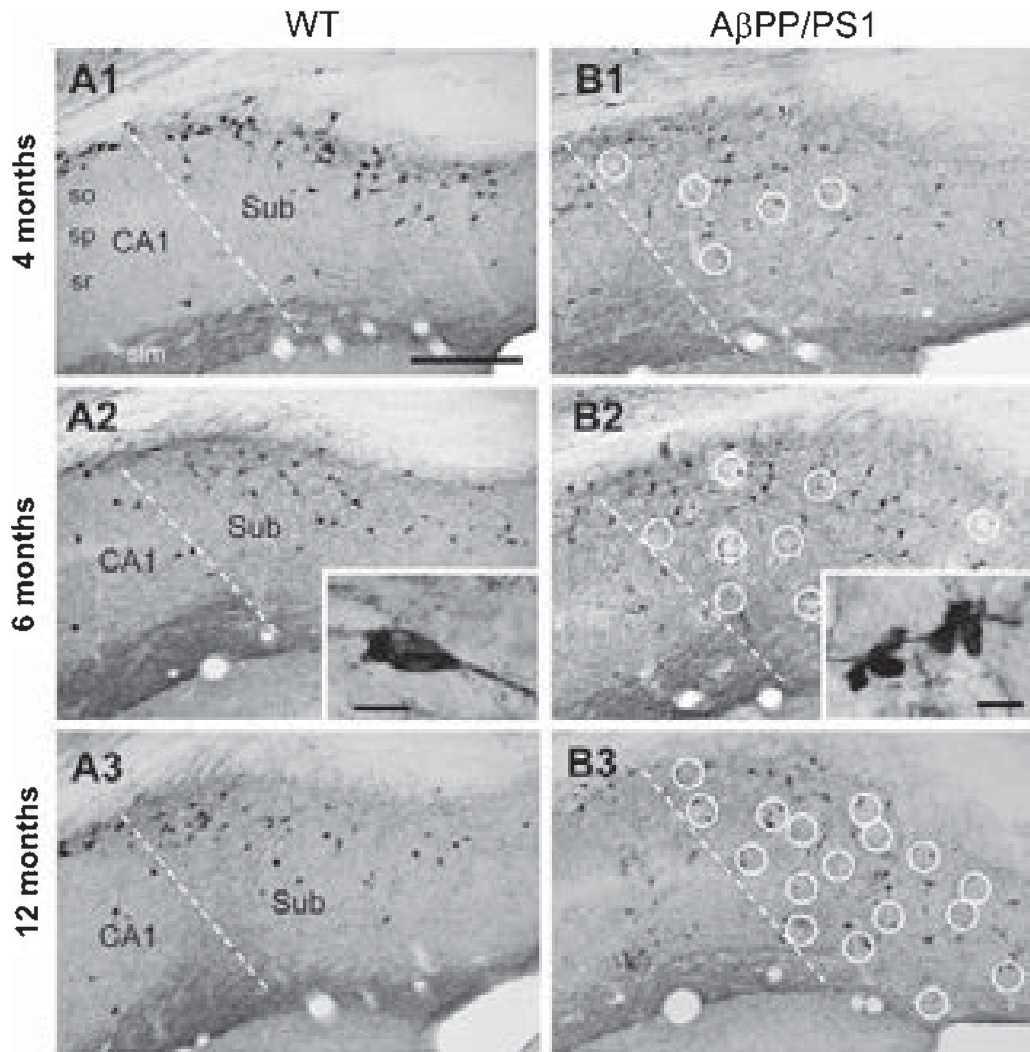
In both cases, the significance was set at 95% of confidence.

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.

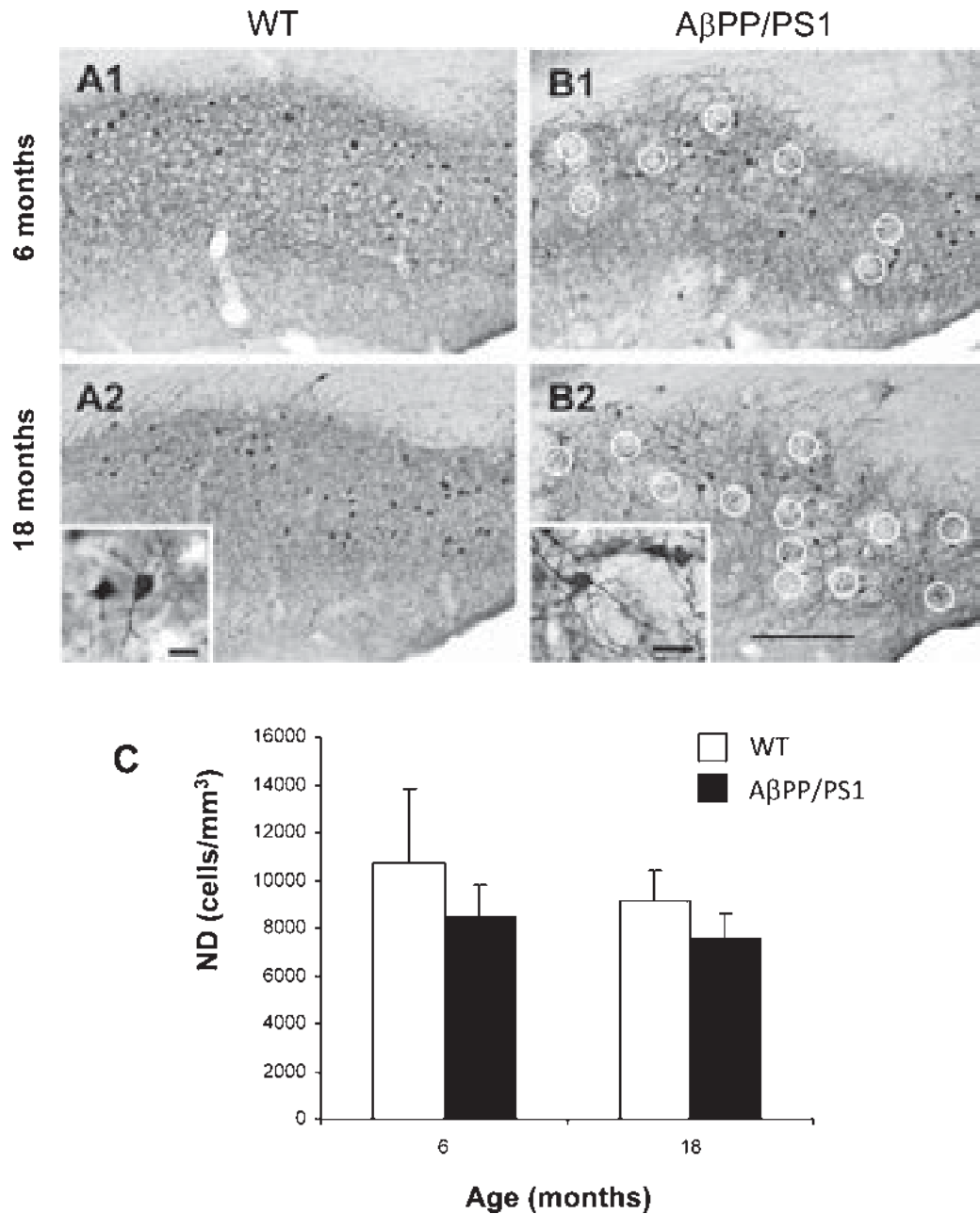


Fig. 2. PV-interneurons are resistant to neurodegeneration in A β PP/PS1 subiculum. Light microscopy images of PV immunoreactivity in the subiculum of WT (A1 and A2) and A β PP/PS1 (B1 and B2) at 6 and 18 months of age. No changes were detected between both genotypes in the number and morphology of these 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

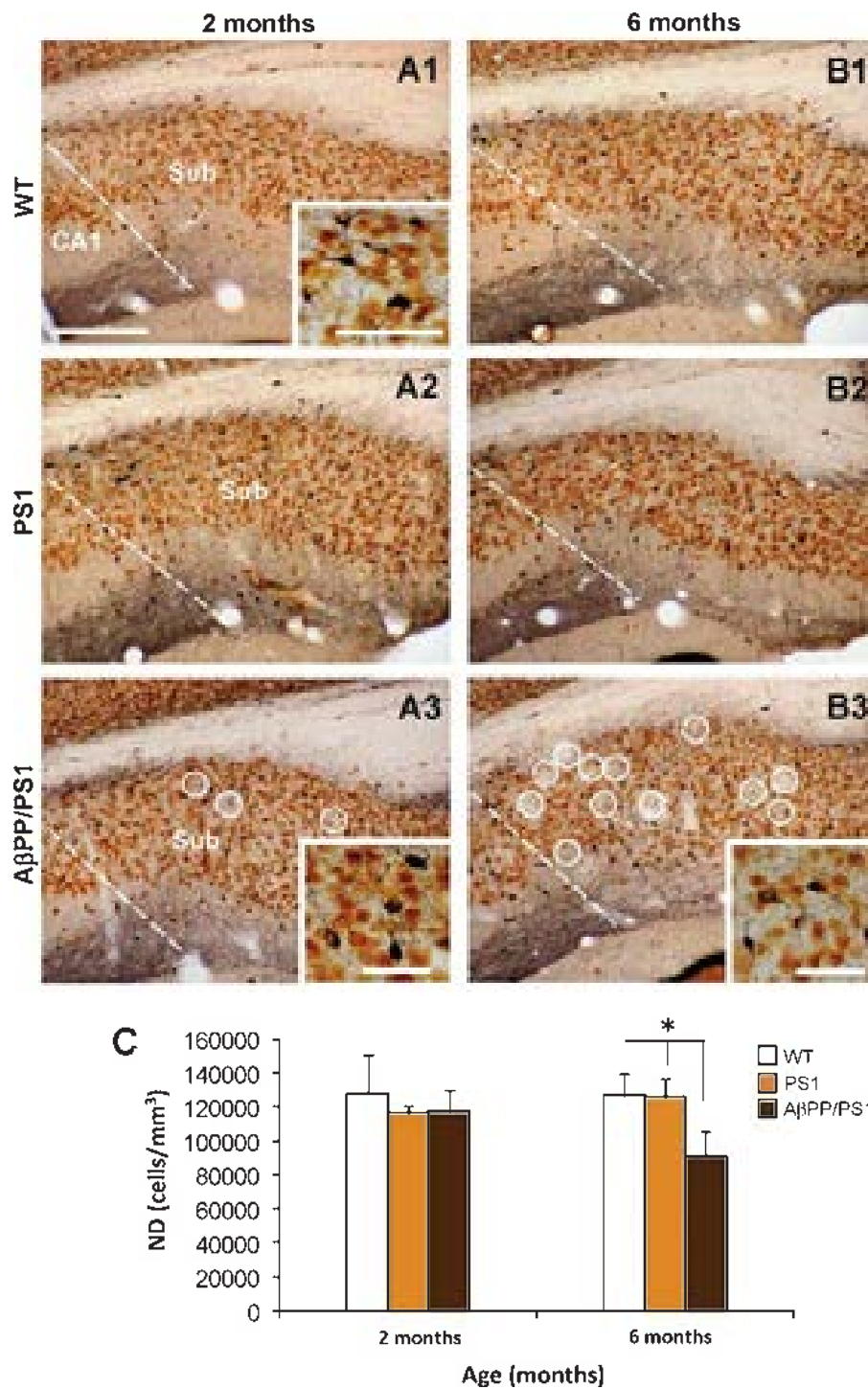


Fig. 3. Loss of principal neurons in the A β PP/PS1 subiculum at early ages. Multiple 5 \times (SOM, PV, CR, VIP and NeuN)-immunolabeling in the subiculum, of WT (A1 and B1), PS1 (A2 and B2), and A β PP/PS1 (A3 and B3) mice at 2 and 6 months of age. Principal neurons (single NeuN-labeled cells in brown 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.

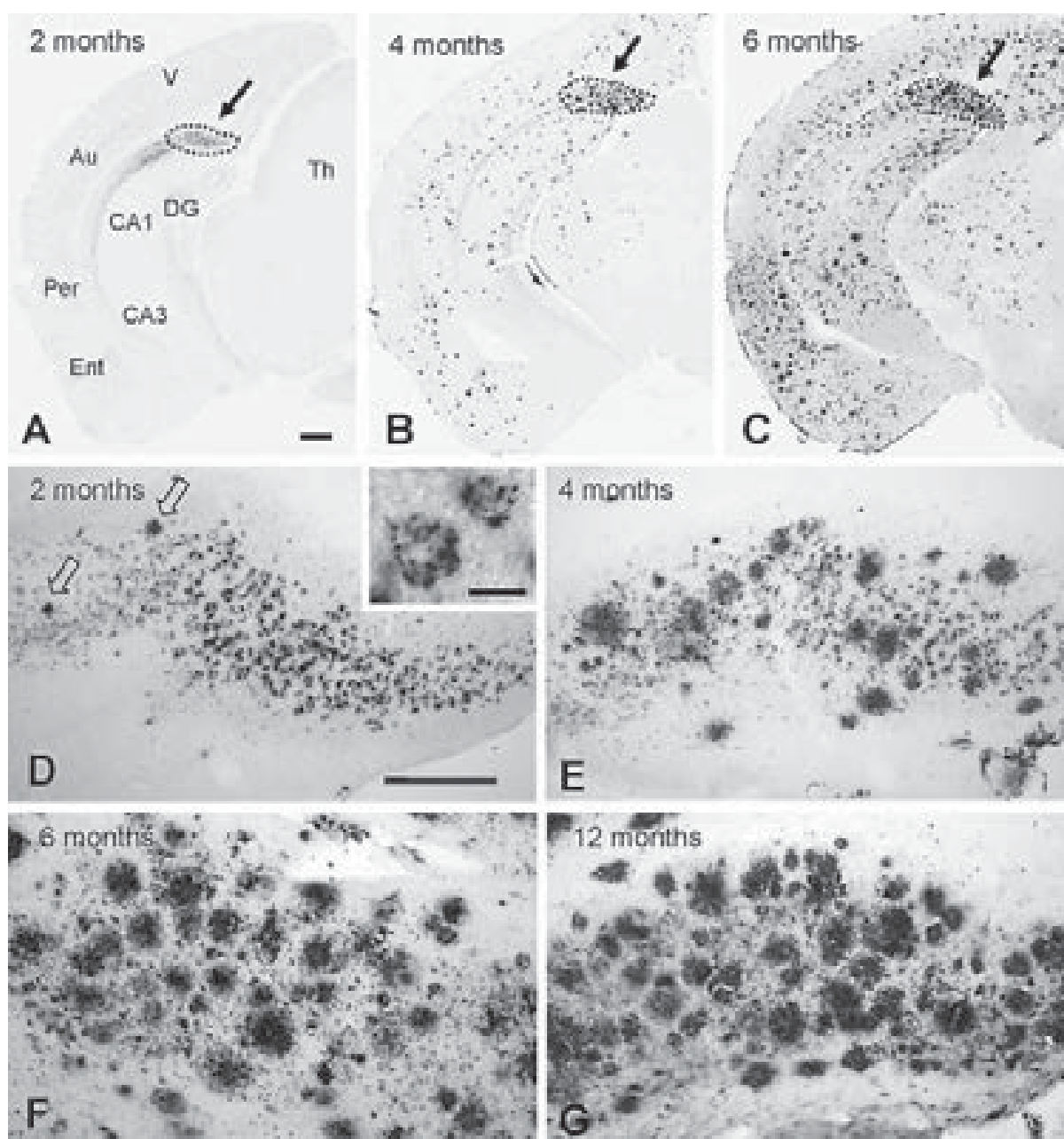


Fig. 4. Early accelerated intra- and extracellular A β accumulation in the A β PP/PS1 subiculum. A β ₄₂ immunohistochemistry at 2 (A and D), 4 (B and E), 6 (C and F), and 12 (G) months of age. A–C, panoramic views of the caudal telencephalon showing the A β ₄₂ immunoreactivity in the subiculum (dashed 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

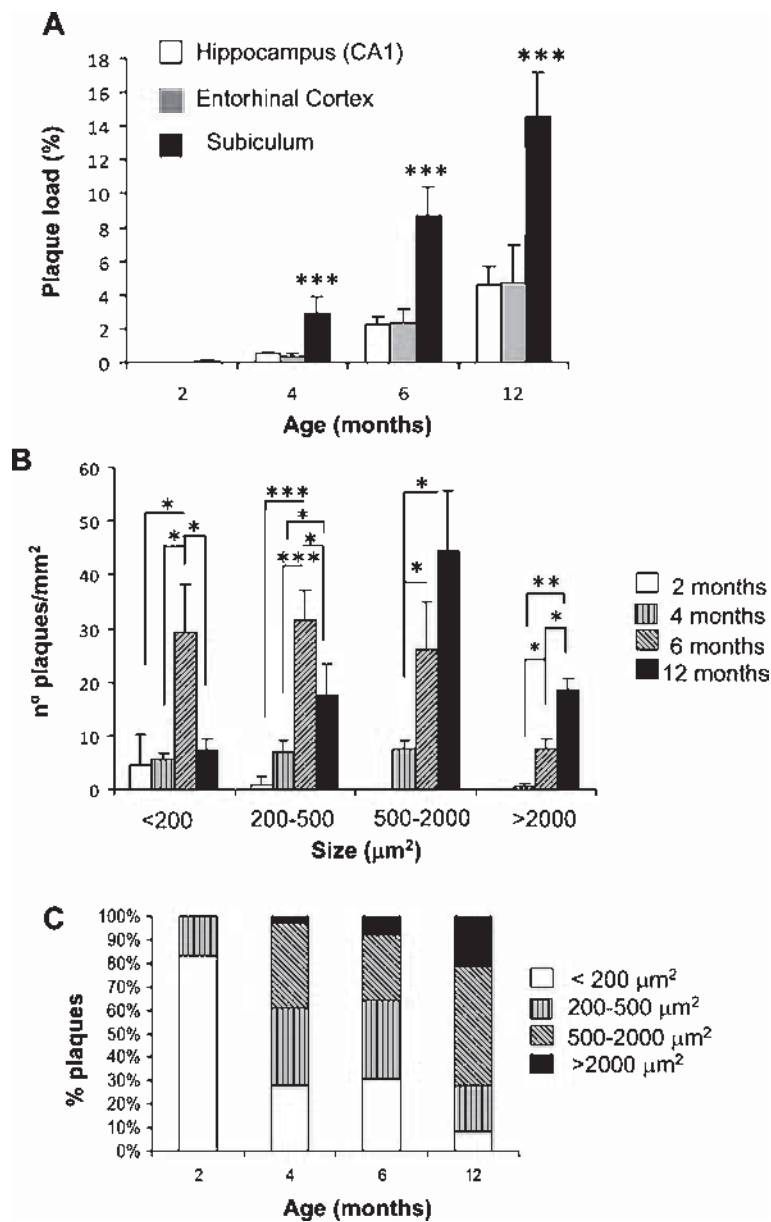


Fig. 5. A β load and plaque progression with age in A β PP/PS1 subiculum. A) A β load in subiculum rapidly increased with age and it was significantly higher than in CA1 and entorhinal cortex at all ages analyzed. B, C) The number (plaques/mm²) and the size (μm²) of the A β plaques in the subiculum exhibited a marked increase with age (two tailed *t*-test, **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001).

2.77 ± 1.17% at 2 and 4 months of age, respectively. A β deposition increased to 8.67 ± 1.70% at 6 months of age and reached to 14.57 ± 0.63% at 12 months (the maximum was at 18 months with 25.31 ± 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

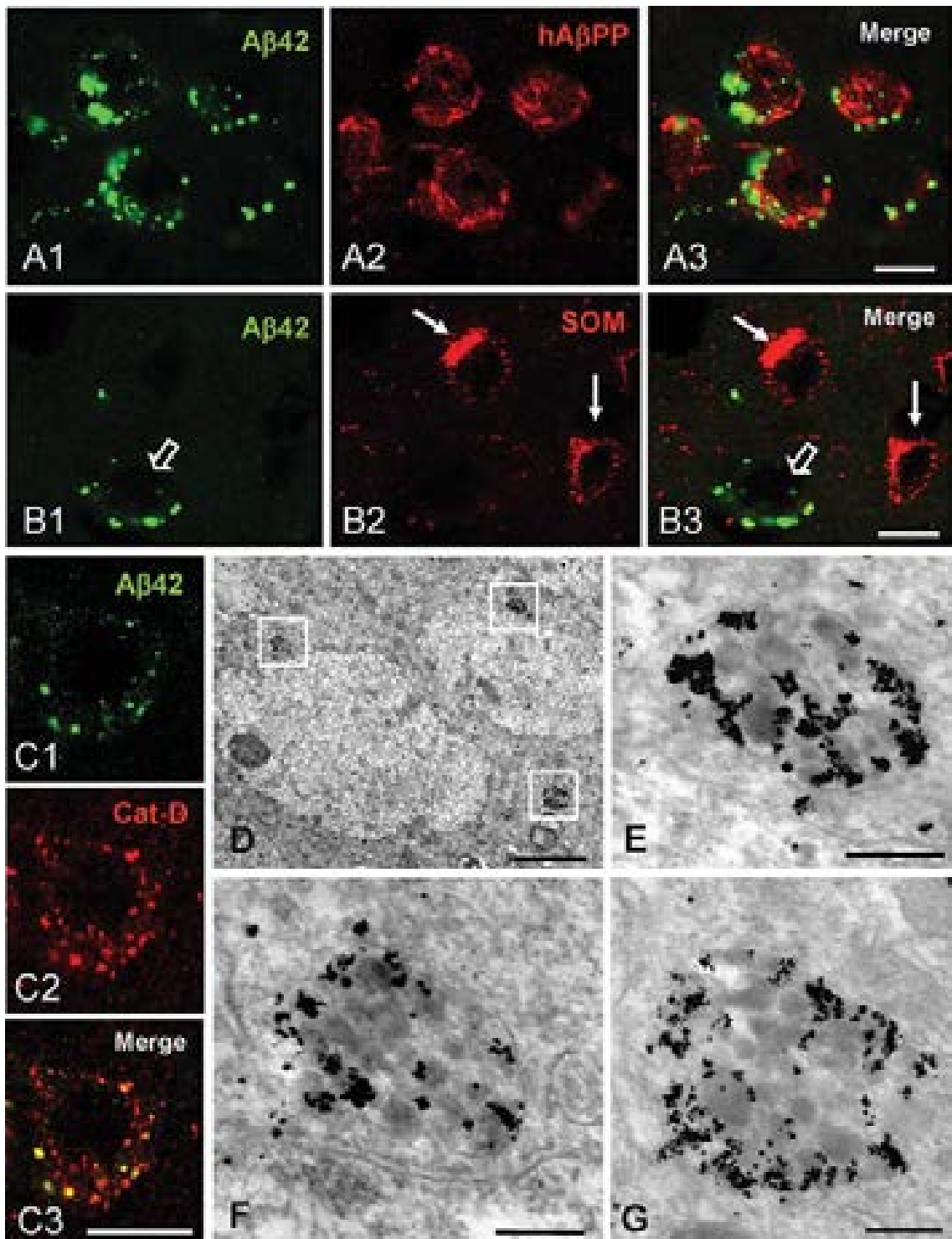


Fig. 6. Intracellular A β is mostly localized in lysosomal vesicles of principal cells. Double confocal immunofluorescence labelings show the presence of A β in A β PP-positive (principal) neurons (A1–A3) but not in SOM-interneurons (B1–B3). Most A β 42 was localized in lysosomal vesicles as shown by 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 organelles of principal neuronal cell bodies. Scale bars: A–C, 10 μ m; D, 2 μ m; E–G, 0.2 μ m.

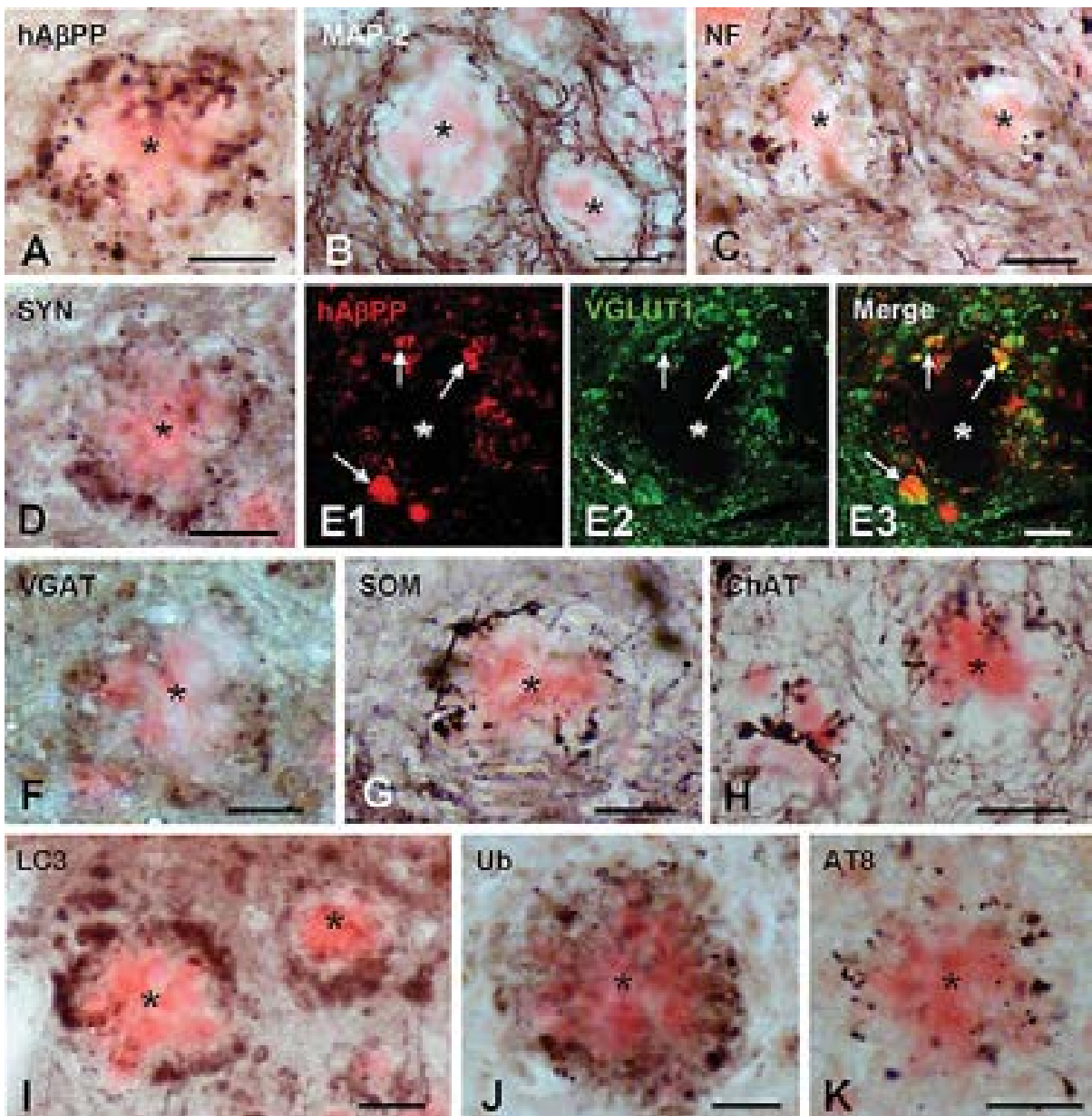


Fig. 7. A β plaques are closely surrounded by axonal/synaptic dystrophies containing phospho-tau and autophagy vesicles. A) A β plaque (Congo red-stained) surrounded by numerous dystrophic neurites immunopositive for hA β PP antibody. B) Dystrophic neurites were not immunopositive for MAP-2 (dendritic 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

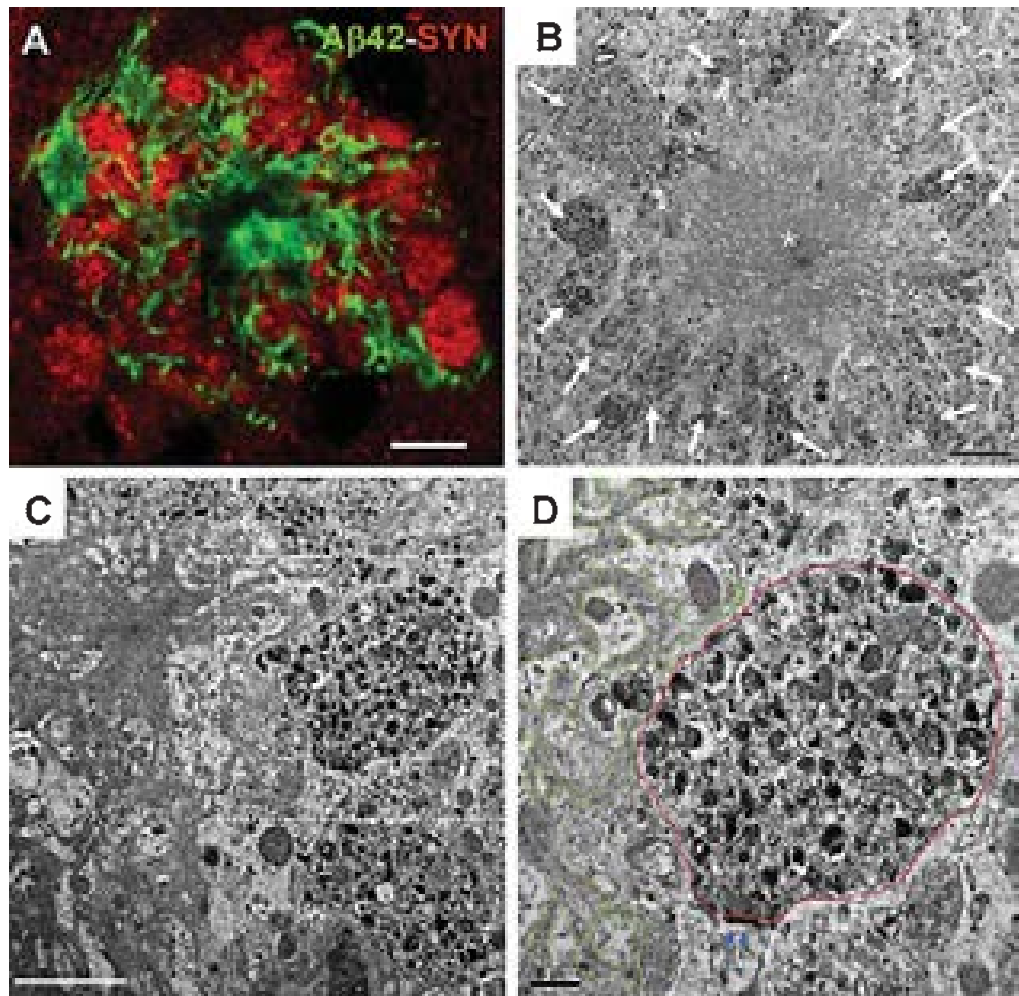


Fig. 8. Tight association between extracellular A β and synaptic dystrophies. A) Double confocal A β_{42} (green) and synaptophysin (SYN, red) labelling show how A β threads from a plaque closely cover SYN-positive dystrophies. B) Electron microscopy micrograph of an A β plaque (asterisk) surrounded 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.

