



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

**ESTUDIO DEL PROCESO NEURODEGENERATIVO
EN LA CORTEZA ENTORRINAL DEL MODELO
TRANSGÉNICO MURINO PS1_{M146L}xAPP_{751SL} DE
LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Memoria presentada por la Licenciada Dña.
Inés Moreno González para optar al Grado
de Doctor por la Universidad de Málaga.

Málaga, 2009



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

INFORMA

Que la Licenciada Dña. Inés Moreno González ha realizado bajo mi dirección el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral, titulada “**Estudio del proceso neurodegenerativo en la corteza entorrinal del modelo transgénico murino PS1_{M146L}xAPP_{751SL} de la enfermedad de Alzheimer**”. Considerando que constituye trabajo de Tesis Doctoral, autorizo su presentación para optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente documento en Málaga, a 14 de abril de 2009.

Fdo.: Antonia Gutiérrez Pérez



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

INFORMA:

Que Dña. Inés Moreno González ha realizado el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral, bajo la dirección de la Dra. Antonia Gutiérrez Pérez, 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, firma el presente documento en Málaga, a 14 de abril de 2009.

Fdo.: José Becerra Ratia

Financiación

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

- Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). Área 4: Patología molecular en la enfermedad de Alzheimer. Neuroinflamación y factores neurotróficos. Entidad Financiadora: Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo. Ref. CB06/05/1116. IP: Dra. Antonia Gutiérrez Pérez. Duración: 2007-2009.
- Caracterización de modelos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer: Estudio celular de cambios neuropatológicos y mecanismos de neuroprotección endógenos en estadios tempranos. Entidad Financiadora: Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo. Ref. FIS PI060556. IP: Dra. Antonia Gutiérrez Pérez. Duración: 2006-2009.
- Immunohistochemical characterization of single (PS1) and double (APPxPS1) transgenic mice models of Alzheimer's disease. Entidad Financiadora: Compañía farmacéutica Sanofi-Aventis (Paris). Ref. 8.07/02.2087. IP: Dra. Antonia Gutiérrez Pérez. Duración: 2003-2006.
- Estudio de la vulnerabilidad GABAérgica y su relación con la inflamación y el estrés de retículo en procesos neurodegenerativos asociados con la edad: envejecimiento y enfermedad de Alzheimer. Entidad Financiadora: Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo. Ref. FIS PI030214. IP: Dra. Antonia Gutiérrez Pérez. Duración: 2003-2006.
- Nodo Fundación Carlos Haya/Centro en Red de Investigación de Enfermedades Neurológicas (Red CIEN). Entidad Financiadora: Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Sanidad y Consumo). Coordinador: Dr. Fernando Rodríguez de Fonseca. Duración: 2003-2006.
- Plan Andaluz de Apoyo a la Investigación (PAI) y grupos consolidados de la Junta de Andalucía Grupo CTS-0161. Entidad Financiadora: Junta de Andalucía. IP: Dra. Adelaida de la Calle. Duración: desde 1995 hasta la actualidad.

Dña. Inés Moreno González, durante este tiempo ha sido beneficiaria de una Beca Predoctoral adscrita a créditos de investigación (Proyecto FIS PI030214 del Instituto de Salud Carlos III y proyecto 8.07/02.2087 de Sanofi-Aventis), así como de un Contrato de Investigación CIBERNED del Instituto de Salud Carlos III.

Publicaciones

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

1. Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, del Rio JC, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuite M, Vitorica J, Gutierrez A. *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). Aceptado, en prensa.
2. Jimenez S, Baglietto-Vargas D, Caballero C, Moreno-Gonzalez I, Torres M, Sanchez-Varo R, Ruano D, Vizuite M, Gutierrez A, Vitorica J. *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*. **Journal of Neuroscience**. 28(45):11650-61 (2008).
3. Montero F, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Lopez-Tellez JF, Gutierrez A, Aledo JC. *Glutaminase activity is confined to the mantle of the islets of Langerhans*. **Biochimie**. 89:1366-1371 (2007).
4. Paz Gavilan M, Revilla E, Pintado C, Castaño A, Vizuite M, Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Vitorica J, Gutierrez A, Ruano D. *Molecular and cellular characterization of the age-related neuroinflammatory processes occurring in normal rat hippocampus: potential relation with the loss of somatostatin GABAergic neurons*. **Journal of Neurochemistry**. 103:984-996 (2007).
5. Caballero C, Jimenez S, Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Gavilan MP, Ramos B, del Río JC, Vizuite M, Gutierrez A, Ruano D, Vitorica J. *The inter-individual variability in the expression of the mutated form of hPS1M146L determined the production of A β peptides in the PS1xAPP transgenic mice*. **Journal of Neuroscience Research**. 85:787-797 (2007).
6. 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. *Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1xAPP transgenic model of Alzheimer's disease*. **Neurobiology of Aging**. 27(11):1658-1672 (2006).
7. Baglietto-Vargas D, Lopez-Tellez JF, Moreno-Gonzalez I, Gutierrez A, Aledo JC. *Segregation of two glutaminase isoforms in islets of Langerhans*. **Biochemical Journal**. 381:483-487 (2004).

Sin duda esta Tesis no es fruto únicamente de mi trabajo. He podido realizarlo gracias a muchas personas que me han ayudado de miles de formas, enseñándome a hacer el trabajo con cariño y dedicación a las cosas bien hechas, por la amistad que me han regalado, con la paciencia del día a día, con el ánimo incondicional y, sobre todo, porque hay gente que ha confiado en mí y me ha dado esta oportunidad. Ahora es el momento de darles las gracias a todos, incluso a aquellos de cuya ayuda ni siquiera eran conscientes.

En primer lugar a mi directora de Tesis, la Dra. Antonia Gutiérrez, o como yo la llamo, “jefita”. Antonia, no tengo espacio suficiente ni palabras para escribir cuánto te agradezco que depositaras en mí tanta confianza desde un principio y lo sigas haciendo. Gracias a ti conseguí un trabajo, una meta que alcanzar, hacer realidad mi vocación y formar parte de un grupo de compañeros y amigos increíbles y que, finalmente, se ha convertido en este manuscrito. Sin ti, tu tesón y tu buen hacer esto no habría sido posible. Gracias de corazón.

Muchas gracias al Dr. Javier Vitorica por las estancias que he realizado en su laboratorio de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla. Javier, gracias por enseñarme las técnicas moleculares empleadas en el presente trabajo, por acogirme con tanta amabilidad en tu laboratorio, por tu inestimable ayuda y consejos y por la estrecha colaboración con nuestro grupo durante todos estos años.

Por supuesto, tengo que agradecer profundamente la ayuda, la dedicación y la amistad de Juan Félix y David, mis niños del laboratorio, mi Juanito y mi Guapi. Vosotros me enseñasteis todo lo que sé en el laboratorio y con ellos he pasado ratos inolvidables en los viajes y en el laboratorio. Me enseñasteis a ser detallista, minuciosa y constante en el trabajo. Sois los mejores maestros que he podido tener, pero por encima de todo aprecio vuestra amistad.

Cuando llegaron Raquel, Elisabeth y Laura, mis niñas Raki, Eli y Laurita, el grupo se hizo más grande. Quiero pensar que algo de lo que me enseñaron a mí os lo he sabido transmitir y creo que lo he conseguido, porque esta Tesis también se ha hecho gracias a vuestra ayuda a lo largo de todo este tiempo y de forma más intensa en los últimos meses. Gracias por estar ahí cuando os he necesitado. Gracias por hacerme reír hasta llorar y compartir tan buenos momentos juntas.

He tenido la suerte de compartir laboratorio con el grupo IRE. Belén, Arquero, Diana, Mariló y Alejandra. Alicia, aquí también te incluyo a ti, porque eres una más de nosotros. Todos me habéis aportado algo imprescindible para este trabajo y habéis sido una parte muy importante para mí tanto a nivel laboral como personal. Gracias por ser como sois.

Me gustaría dar las gracias a mis compañeros de la sala de becarios, Ruth, Luís y Patricia y, especialmente, a Loli por su amistad y candidez. También a las niñas del fondo, a Pilar, Silvia, Eva, Mercedes y Leo, sin olvidar a Iván y Rick. Gracias por hacerme los días más llevaderos y darme buenos consejos. No me puedo olvidar de todos los que han pasado por nuestro laboratorio: Carolina, Fernando, Seve, Isa, Vanesa... Todos han aportado su granito de arena en este trabajo.

Al director del departamento de Biología Celular, el Dr. José Becerra, por permitirme realizar mi trabajo de investigación en las instalaciones del departamento y apoyar siempre a todos los becarios. A todos los profesores del departamento de Biología Celular, por su profesionalidad y su cercanía. También a Ana, Ángel y Silvia, por su estupendo carácter y por su ayuda con los trámites de la Tesis y la gestión del laboratorio.

A todos los profesionales que han contribuido a esta Tesis de los servicios centrales de apoyo a la investigación, en especial a Manoli y Salvador por su ayuda en las técnicas de análisis de imagen y el soporte informático de esta Tesis. A David, por su inestimable ayuda con el manejo del microscopio confocal y la realización de las imágenes de fluorescencia de este manuscrito. Al Dr. José Ángel Aguirre por permitirme el uso del microscopio estereológico. Al personal técnico del estabulario de la Universidad de Málaga por su buen hacer, amabilidad y facilitarme el trabajo.

Agradecimientos

Al Dr. Jesús Benavides, por su amabilidad e increíble acogida durante los tres meses de estancia predoctoral en las instalaciones del laboratorio de enfermedades neurodegenerativas de la empresa farmacéutica Sanofi-Aventis en París, Francia. Gracias por esta oportunidad de formación científica en un centro tan prestigioso y trabajar con la línea de animales transgénicos objeto de estudio de esta Tesis. También quiero agradecer la ayuda y las enseñanzas recibidas por todos los miembros de su grupo.

Muchas gracias a todos los miembros del equipo del Dr. Javier Vitorica: Diego, Marisa, Sebastián, Cristina, Manuel, M^a Paz, Blanca y Juan Carlos. Sin ellos, este trabajo no hubiera sido lo mismo.

Gracias al Dr. Klein de la Universidad de Illinois y al Dr. Comella de la Universidad de Lérida por la cesión de los anticuerpos NU4, M71/3 y FAIM_L.

Quiero darle las gracias a mis grandes amigas, Eva, Meme, Inés, Ana, Vicky, Oli y Carmen. Sois geniales y sin vosotras no hubiera tenido los ánimos necesarios para realizar la Tesis. Gracias de todo corazón.

Para terminar, no puedo acabar este capítulo de agradecimientos sin acordarme de mi familia. Todos se merecen un apartado especial. Quiero agradecer a mi madre ser lo que soy, haberme aconsejado siempre tan bien y ser tan especial como eres. No hay otra igual. Este es el resultado de tantos años de dedicación. También a mi hermana, Carolina. Ella siempre ha sido un gran ejemplo a seguir y espero que esté tan orgullosa de mí como yo lo estoy de ella. Gracias a mi padre por apoyarme y darme ánimos desde la distancia. Finalmente, quiero darle las gracias a Juan. Gracias por comprender mi trabajo, por los fines de semana de trabajo sin quejas, por los ánimos incondicionales, sobre todo estos últimos meses. Gracias por estar ahí siempre que te he necesitado, incluso cuando no te he pedido nada. Gracias.

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

A mi familia

A Juan

“... Nadie ignora que nuestro esquema teórico sobre el funcionamiento de la substancia gris varia de lustro en lustro al compás de las nuevas conquistas metodológicas; pero nótese que en cada avatar, la teoría se depura de errores, precisa sus líneas, explica mayor número de hechos, conviene mejor con verdades pertenecientes a dominios afines, y sin representar todavía la verdad entera, contiene cada vez un mayor número de elementos de la verdad. Así pues, deberemos considerar como plausible y temporalmente aceptable, toda hipótesis que, sin explicar totalmente un fenómeno, represente una fase necesaria de este proceso ideal hacia lo verdadero, y dé fruto de investigación; y sólo reputaremos inaceptable e inútil la que, por insuficiente, no pueda ser comprendida en dicho proceso ni posea virtualidad bastante a provocar en el campo científico corrientes de pensamiento y de acción. Lo que deberemos evitar siempre, será el tomar dichas teorías (construcciones transitorias destinadas a sintetizar artificialmente los hechos y hacer factible una ojeada de conjunto) como verdades firmes, como edificios definitivos donde reposar del áspero análisis, ceguera perniciosa de que podríamos citar muchos y bien altos ejemplos...”

...Y con esto terminamos esta ya larga serie de advertencias y consideraciones. Ahora no queda sino suplicar al benévolo lector que al formular su fallo inapelable, mire, antes que a lo mezquino del resultado, al esfuerzo y tiempo que ha requerido el conseguirlo, y sobre todo, a la intención por demás sana y patriótica que ha guiado al autor.”

Santiago Ramón y Cajal

“Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados”

Madrid, Julio de 1899

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Enfermedad de Alzheimer	3
1.1.1. Neuropatología	3
1.1.2. Sintomatología	5
1.1.3. Tipos de Alzheimer	5
1.1.3.1. Alzheimer Familiar (FAD)	6
1.1.3.2. Alzheimer Esporádico	6
1.1.4. Factores de riesgo	7
1.1.5. Diagnóstico y tratamiento	10
1.2. Péptido β-amiloide	14
1.2.1. La proteína precursora amiloide (APP)	14
1.2.2. Procesamiento del APP y generación del β -amiloide	16
1.2.2.1. Ruta no amiloidogénica	16
1.2.2.2. Ruta amiloidogénica	17
1.2.3. Presenilina 1 y Presenilina 2	18
1.2.4. Degradación del β -amiloide	19
1.2.5. Tipos de depósitos extracelulares de β -amiloide	20
1.2.5.1. Placas neuríticas	20
1.2.5.2. Placas difusas	20
1.2.6. Acumulación intracelular de β -amiloide	20
1.2.7. Formas oligoméricas de β -amiloide	22
1.2.8. Hipótesis de la cascada amiloide	23
1.3. Ovillos neurofibrilares y proteína tau hiperfosforilada	24
1.4. Pérdida neuronal y sináptica	27
1.4.1. Pérdida neuronal	27
1.4.1.1. Pérdida neuronal en la enfermedad de Alzheimer	27
1.4.1.2. Mecanismos de muerte neuronal	28
1.4.2. Pérdida sináptica	29
1.5. Neuroinflamación	30
1.5.1. Microglía	31
1.5.2. Astrogliá	35
1.5.3. Células dendríticas	36
1.5.4. Linfocitos T	37
1.5.4.1. Linfocitos T helper o colaboradores (Th)	37
1.5.4.2. Linfocitos T citotóxicos (Tc)	38
1.5.5. Citoquinas	38
1.5.6. Radicales libres	41
1.6. Modelos animales transgénicos de la enfermedad de Alzheimer	41
1.6.1. Animales transgénicos PS1	42
1.6.2. Animales transgénicos APP	42
1.6.3. Animales transgénicos PS1xAPP	43
1.6.4. Animales transgénicos BACE	44
1.6.5. Animales transgénicos APPxBACE	44
1.6.6. Animales transgénicos TAU	45
1.6.7. Animales transgénicos TAUxAPP	45
1.6.8. Animales triple transgénicos PS1xAPPxTAU	46

1.6.9. Animales transgénicos inducibles	46
1.7. Corteza entorrinal	48
1.7.1. Límites anatómicos, citoarquitectura y subdivisiones	48
1.7.2. Conexiones extrínsecas	51
1.7.2.1. Conexiones de la corteza entorrinal con la formación hipocampal	51
1.7.2.2. Conexiones de la corteza entorrinal con zonas corticales	54
1.7.2.3. Conexiones de la corteza entorrinal con zonas subcorticales	57
1.7.3. Conexiones intrínsecas	57
1.7.4. Tipos neuronales corticales	59
1.7.4.1. Neuronas principales	59
1.7.4.2. Interneuronas	60
1.7.4.2.1. Tipos de interneuronas según sus características morfológicas	62
1.7.4.2.2. Tipos de interneuronas según sus características moleculares (neuroquímicas)	66
1.7.4.3. Tipos neuronales de las capas de la corteza entorrinal	69
1.7.5. Corteza entorrinal y memoria. Implicación en la enfermedad de Alzheimer	74
1.8. Planteamiento del trabajo y Objetivos	77
 2. MATERIALES Y MÉTODOS	 81
2.1. Animales de experimentación	83
2.1.1. Genotipos	83
2.1.2. Edad, número, procedencia y mantenimiento	83
2.1.3. Animales con dieta suplementada con litio	84
2.1.4. Legislación	85
2.1.5. Delimitación de la corteza entorrinal	85
2.2. Técnicas inmunohistoquímicas	88
2.2.1. Preparación del tejido	88
2.2.1.1. Proceso de fijación	88
2.2.1.2. Crioprotección y congelación	88
2.2.1.3. Obtención de secciones	88
2.2.2. Marcaje inmunohistoquímico	89
2.2.2.1. Pretratamiento	89
2.2.2.2. Marcadores analizados mediante inmunohistoquímica	90
2.2.2.3. Inmunohistoquímica simple para campo claro	91
2.2.2.4. Inmunohistoquímica doble para campo claro (SOM/NeuN)	94
2.2.2.5. Inmunohistoquímica múltiple (5x) a microscopía de campo claro para diferenciar células principales de interneuronas	95
2.2.2.6. Marcaje inmunofluorescente doble para microscopía convencional de fluorescencia y microscopía láser confocal	97
2.2.2.7. Controles de la técnica inmunohistoquímica	99
2.3. Tinciones histológicas	100
2.3.1. Tinción general de células con Violeta de Cresilo	100

2.3.2. Marcaje fluorescente de células microgliales con Lectina de Tomate	100
2.3.3. Marcaje fluorescente de placas amiloides fibrilares con Tioflavina-S	100
2.3.4. Marcaje fluorescente nuclear con DAPI	101
2.3.5. Tinción de placas amiloides fibrilares con Rojo Congo	101
2.4. Obtención de imágenes microscópicas	102
2.4.1. Imágenes para microscopía convencional de campo claro	102
2.4.2. Imágenes para microscopía de fluorescencia	102
2.4.3. Procesamiento de imágenes	102
2.5. Técnicas estereológicas	103
2.5.1. Recuento celular: Densidad numérica	103
2.5.2. Estimación del volumen. Principio de Cavalieri	105
2.5.3. Tamaño y densidad de placas	106
2.6. Carga amiloide: Análisis de imagen	106
2.7. Técnicas autorradiográficas	107
2.7.1. Preparación del tejido	107
2.7.2. Unión del ligando	107
2.7.3. Adquisición y procesamiento de imágenes	108
2.8. Técnicas moleculares	108
2.8.1. Preparación del tejido	109
2.8.2. Microdissección láser	109
2.8.3. Extracción del ARN	110
2.8.4. Cuantificación del ARN	110
2.8.5. Retrotranscripción de ARN a ADNc	111
2.8.6. Reacción de la Polimerasa en Cadena	111
2.8.6.1. Preamplificación con PCR convencional	112
2.8.6.2. PCR a tiempo real	116
2.8.6.3. Electroforesis en gel de agarosa	117
2.9. Análisis estadístico de datos	118
2.10. Apéndice	118
2.10.1. Tampones para inmunohistoquímica	118
2.10.2. Solución fijadora	119
2.10.3. Solución crioprotectora	119
2.10.4. Portaobjetos gelatinizados	119
2.10.5. Protocolo de deshidratación y montaje	120
2.10.6. Medio de montaje para inmunohistoquímica fluorescente	120
2.10.7. Soluciones para autorradiografía	120
2.10.8. Tinción para la microdissección láser (Hematoxilina de Mayer)	120
3. RESULTADOS	123
3.1. Vulnerabilidad neuronal en la corteza entorrinal del modelo PS1xAPP	125
3.1.1. Interneuronas GABAérgicas	128
3.1.1.1. Disminución selectiva de los niveles de ARNm para SOM en los animales PS1xAPP a los 6 meses de edad	128
3.1.1.2. Disminución significativa de la densidad de interneuronas SOM-positivas en los animales PS1xAPP a los 6 meses de edad	128

3.1.1.3. La disminución del número de interneuronas SOM-positivas se debe a un proceso neurodegenerativo temprano	131
3.1.1.4. La población de interneuronas NPY-positivas es también muy vulnerable a edades tempranas en el modelo PS1xAPP	138
3.1.1.5. Las interneuronas que expresan PV son resistentes al proceso de neurodegeneración en el modelo PS1xAPP	145
3.1.1.6. Las interneuronas que expresan CR se ven afectadas de forma diferencial en el modelo PS1xAPP a edades tempranas	145
3.1.2. Neuronas principales	154
3.1.2.1. Existe pérdida significativa de neuronas principales en las capas profundas de la corteza entorrinal del modelo PS1xAPP a los 6 meses de edad	154
3.1.2.2. Disminución en la expresión de factores pro-supervivencia y aumento de factores pro-apoptóticos en la corteza entorrinal del modelo PS1xAPP a edades tempranas	162
3.1.3. Neuritas distróficas	168
3.1.3.1. El proceso neurodegenerativo temprano va acompañado de la presencia de neuritas distróficas, fundamentalmente axones, de naturaleza GABAérgica y glutamatérgica	168
3.1.4. Sinapsis	169
3.1.4.1. El proceso neurodegenerativo temprano en la corteza entorrinal va acompañado de cambios sinápticos	169
3.2. Progresión de la patología amiloidea en la corteza entorrinal del modelo PS1xAPP. Expresión extracelular e intracelular de β-amiloide	172
3.2.1. Las neuronas principales de la corteza entorrinal, excepto las de capa V, expresan la forma humana mutada de la proteína APP en el modelo PS1xAPP	172
3.2.2. Patrón de expresión temporal del β -amiloide extracelular en la corteza entorrinal. La formación de placas comienza desde edades muy tempranas y de forma preferente en las capas profundas	176
3.2.3. Las capas profundas de la corteza entorrinal presentan la mayor carga amiloide, con un aumento del tamaño y el número de placas con la edad	183
3.2.4. Existe una gran variabilidad interindividual en la carga amiloide de la corteza entorrinal del modelo PS1xAPP a edades tempranas	192
3.2.5. β -amiloide intracelular en la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP. Las neuronas principales, excepto las de capa V, son inmunopositivas para 6E10 y NU4	197
3.2.6. Las neuronas principales de capa V de la corteza entorrinal, a diferencia de otras regiones corticales, no expresan hAPP y, por lo tanto, no son inmunorreactivas para anticuerpos contra β -amiloide	201
3.2.7. No existe acumulación de β -amiloide intracelular a edades tempranas en ninguna de las capas de la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP	204
3.3. Proceso neuroinflamatorio temprano en la corteza entorrinal del modelo PS1xAPP. Papel de las células gliales	212

3.3.1. Existe activación glial temprana en la corteza entorrinal coincidente con la aparición de los depósitos amiloides	216
3.3.2. Existe un incremento temprano en la expresión de factores pro-inflamatorios citotóxicos y receptores de muerte en los animales PS1xAPP	227
3.3.3. La microglía activada que rodea estrechamente a las placas presenta un fenotipo alternativo	234
3.3.4. El factor neurotrófico IGF1 es expresado por la microglía activada asociada a las placas amiloides	237
3.3.5. Expresión de interleuquina IL4 por astrocitos y linfocitos T en la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP	242
3.3.6. Existe disminución de los niveles de fractalquina en la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP	242
3.4. Estudio de la administración oral crónica de carbonato de litio sobre la neurodegeneración temprana en la corteza entorrinal	245
3.4.1. La administración crónica oral de carbonato de litio en los animales PS1xAPP previene la muerte neuronal en la corteza entorrinal	245
3.4.2. El litio ejerce un efecto neuroprotector sobre las neuronas que expresan SOM y NPY en los animales PS1xAPP	245
3.4.3. El tratamiento con litio no parece afectar a la carga amiloide en la corteza entorrinal, pero sí al tipo de placa	251
3.4.4. El tratamiento con litio disminuye la activación microglial en la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP	251
3.4.5. El tratamiento con litio disminuye la densidad de neuritas distróficas inmunomarcadas con AT8 en los animales PS1xAPP	253
4. DISCUSIÓN	257
4.1. Neurodegeneración selectiva de interneuronas en la corteza entorrinal del modelo PS1xAPP a edades tempranas	261
4.1.1. Las interneuronas que expresan SOM y/o NPY son altamente vulnerables en las fases tempranas de la patología amiloide	261
4.1.1.1. Heterogeneidad en la población de interneuronas SOM y/o NPY-positivas ante el proceso neurodegenerativo	262
4.1.1.2. Implicación de la pérdida de interneuronas SOM/NPY-positivas en los procesos cognitivos	264
4.1.1.3. Implicación de la pérdida de interneuronas SOM-positivas en los niveles de β -amiloide	266
4.1.2. Las interneuronas que expresan CR en las capas profundas de la corteza entorrinal son vulnerables al proceso neurodegenerativo a edades tempranas	267
4.1.3. Las interneuronas que expresan PV son resistentes al proceso neurodegenerativo	268
4.2. Neurodegeneración temprana de células principales en las capas profundas de la corteza entorrinal del modelo PS1xAPP	269
4.2.1. Las neuronas principales de las capas profundas son vulnerables en las fases iniciales de la patología amiloide	269

4.2.2. Consecuencias de la pérdida neuronal en los procesos de memoria y aprendizaje en la corteza entorrinal.	272
4.3. El β-amiloide extracelular, y no el intracelular, induce el proceso neurodegenerativo temprano de la corteza entorrinal	272
4.3.1. La muerte de neuronas de la corteza entorrinal en fases tempranas de la patología amiloidea no es inducida por acumulación de β -amiloide intracelular	273
4.3.2. La formación de depósitos de β -amiloide tiene lugar, preferentemente, en las capas profundas de la corteza entorrinal, proceso que se correlaciona con la conectividad de esta región cerebral y la liberación sináptica de β -amiloide	275
4.4. La respuesta inflamatoria citotóxica es, posiblemente, junto al β-amiloide extracelular, responsable de la neurodegeneración temprana en la corteza entorrinal	279
4.4.1. La deposición de β -amiloide extracelular induce una activación glial potencialmente citotóxica desde edades tempranas en la corteza entorrinal	279
4.4.2. La diferenciación microglial afecta a la progresión patológica del Alzheimer y su modulación fenotípica abre futuras vías para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas	282
4.4.3. La corteza entorrinal y el hipocampo poseen ambientes inflamatorios completamente opuestos en el modelo PS1xAPP a los 6 meses de edad	285
4.5. La administración crónica de carbonato de litio en la dieta posee un efecto neuroprotector en la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP	287
4.5.1. El tratamiento con litio previene la neurodegeneración temprana	287
4.5.2. El tratamiento con litio no parece afectar a la carga amiloide, aunque sí reduce la activación microglial citotóxica	289
4.6. Reflexión final	291

5. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS **295**

6. SUMMARY **301**

6.1. Abstract	305
6.2. Literature outline	306
6.2.1. Cellular biology of β -amyloid precursor protein (APP)	307
6.2.2. APP processing	307
6.2.3. APP mutations	308
6.2.4. Amyloid- β peptide	308
6.2.5. Amyloid- β toxicity	309
6.2.6. The amyloid cascade hypothesis	309
6.2.7. Inflammation in Alzheimer's disease	310
6.2.8. Entorhinal cortex	311
6.3. Aims of the study	313
6.4. Materials and Methods	316
6.4.1. Transgenic mice	316
6.4.2. Anatomical boundaries	316

6.4.3. Laser capture microdissection	317
6.4.4. RNA extraction and isolation	317
6.4.5. RT-PCR and real-time PCR	317
6.4.6. Tissue preparation	318
6.4.7. Immunohistochemistry	318
6.4.8. Thioflavin S staining	320
6.4.9. Stereological analysis	320
6.4.10. Entorhinal cortex volume	320
6.4.11. Plaque Loading Quantification	320
6.4.12. Plaque Size Morphometric Analysis	321
6.4.13. Statistical analysis	321
6.5. Results and Discussion	321
6.5.1. The expression of SOM mRNA was selectively reduced in the entorhinal cortex of PS1xAPP at 6 months of age	321
6.5.2. The decrease in SOM mRNA was paralleled by a reduced number of SOM expressing cells in the entorhinal cortex of PS1xAPP at 6 months of age	322
6.5.3. The loss of SOM and/or NPY interneurons is probably due to a neurodegenerative process in this PS1xAPP model	323
6.5.4. A significant decrease in the number of NPY-positive interneurons at early ages in the entorhinal cortex of PS1xAPP	323
6.5.5. Interneurons expressing Parvalbumin are highly resistant to neurodegeneration in the entorhinal cortex of PS1xAPP model	324
6.5.6. Differential lamina-dependent vulnerability of Calretinin expressing neurons	324
6.5.7. The number of principal cells was selectively decreased in the infragranular layers of entorhinal cortex of PS1xAPP at 6 months of age	325
6.5.8. The neurodegenerative process was paralleled by a reduction in VGAT mRNA in the entorhinal cortex of PS1xAPP at 6 months of age	326
6.5.9. Neurodegeneration in the deep entorhinal cortex correlated with extracellular A β rather than intracellular A β accumulation	327
6.5.10. Early entorhinal neurodegeneration in superficial and deep layers coincides with widespread cytotoxic glial inflammatory response	330
6.5.11. Chronic lithium treatment prevents neurodegeneration in the entorhinal cortex of PS1xAPP mice	333

7. BIBLIOGRAFÍA

339

Índice de figuras

Figura 3.1. Organización laminar de la corteza entorrinal lateral a 2 y 6 meses de edad.	126
Figura 3.2. Organización laminar de la corteza entorrinal lateral a 12 y 18 meses.	127
Figura 3.3. Niveles de expresión de los ARNm para los marcadores de las principales poblaciones de interneuronas (SOM, NPY, PV y CR).	129
Figura 3.4. Inmunohistoquímica para células somatostatina en la corteza entorrinal lateral de animales WT (A y D), PS1 (B y E) y PS1xAPP (C y F) de 2 (A-C) y 4 (D-F) meses de edad.	132
Figura 3.5. Inmunohistoquímica para células somatostatina en la corteza entorrinal lateral de animales WT (A y D), PS1 (B y E) y PS1xAPP (C y F) de 6 (A-C) y 12 (D-F) meses de edad.	133
Figura 3.6. Inmunohistoquímica para células somatostatina en la corteza entorrinal lateral de animales WT (A), PS1 (B) y PS1xAPP (C) de 18 meses de edad.	134
Figura 3.7. Recuento estereológico de la población de interneuronas SOM-positivas en la corteza entorrinal. A) estudio en animales WT, PS1 y PS1xAPP desde los 2 a los 18 meses de edad y B) estudio en capas superficiales (I-III) y profundas (IV-VI) en WT y PS1xAPP a los 6 meses.	135
Figura 3.8. Doble marcaje inmunohistoquímico para SOM (azul) y NeuN (marrón) en la corteza entorrinal de animales WT (A y D), PS1 (B y E) y PS1xAPP (C y F) de 6 meses de edad.	136
Figura 3.9. Recuento estereológico de la población de interneuronas SOM-positivas y de la población NeuN-positiva (neuronas en general) en las mismas secciones de corteza entorrinal de animales WT, PS1 y PS1xAPP de 6 meses de edad.	137
Figura 3.10. Inmunohistoquímica para NPY en la corteza entorrinal de animales WT (A y D), PS1 (B y E) y PS1xAPP (C y F) de 2 (A-C) y 4 (D-F) meses de edad.	140
Figura 3.11. Inmunohistoquímica para NPY en la corteza entorrinal de animales WT (A y D), PS1 (B y E) y PS1xAPP (C y F) de 6 (A-C) y 12 (D-F) meses de edad.	141
Figura 3.12. Inmunohistoquímica para NPY en la corteza entorrinal de animales WT (A), PS1 (B) y PS1xAPP (C) de 18 meses de edad.	142
Figura 3.13. Recuento estereológico de la población de interneuronas NPY-positivas en la corteza entorrinal en los animales WT, PS1 y PS1xAPP desde los 2 a los 18 meses de edad.	143
Figura 3.14. Inmunofluorescencia doble para SOM (rojo) /NPY (verde) a microscopía confocal en secciones de corteza entorrinal de animales WT y PS1xAPP a 6 meses de edad.	144
Figura 3.15. Inmunohistoquímica para parvalbúmina en la corteza entorrinal de animales WT (A y D), PS1 (B y E) y PS1xAPP (C y F) de 2 (A-C) y 4 (D-F) meses de edad.	146
Figura 3.16. Inmunohistoquímica para PV en la corteza entorrinal de animales WT (A y D), PS1 (B y E) y PS1xAPP (C y F) de 6 (A-C) y 12 (D-F) meses de edad.	147
Figura 3.17. Inmunohistoquímica para PV en la corteza entorrinal de animales WT (A), PS1 (B) y PS1xAPP (C) de 18 meses de edad.	148
Figura 3.18. Recuento estereológico de la población de interneuronas PV-positivas en la corteza entorrinal de los animales WT, PS1 y PS1xAPP desde los 2 a los 18 meses de edad.	149
Figura 3.19. Inmunohistoquímica para calretinina en la corteza entorrinal de animales WT (A y D), PS1 (B y E) y PS1xAPP (C y F) de 2 (A-C) y 6 (D-F) meses de edad.	151
Figura 3.20. Inmunohistoquímica para calretinina en la corteza entorrinal de animales WT (A), PS1 (B) y PS1xAPP (C) de 18 meses de edad.	152

Figura 3.21. Recuento estereológico de la población de neuronas CR-positivas en la corteza entorrinal. A) Estudio en animales WT, PS1 y PS1xAPP a lo largo del envejecimiento. B) Estudio en animales WT y PS1xAPP a 2 y 6 meses, diferenciando las poblaciones de capas superficiales (I-III) y capas profundas (IV-VI).	153
Figura 3.22. Estudio de las neuronas principales en la corteza entorrinal a los 2 meses de edad. A-C) Inmunohistoquímica múltiple para interneuronas (SOM, NPY, PV y CR) y neuronas en general (NeuN) en animales WT (A y A1), PS1 (B) y PS1xAPP (C y C1). D) Recuento estereológico de la densidad (neuronas/mm ³) de neuronas principales en capas superficiales (I-III) y capas profundas (IV-VI).	156
Figura 3.23. Estudio de la población de neuronas principales en la corteza entorrinal a los 6 meses de edad. A-C) Inmunohistoquímica múltiple para interneuronas (SOM, NPY, PV y CR) y neuronas en general (NeuN) en animales WT (A y A1), PS1 (B) y PS1xAPP (C y C1). D) Recuento estereológico de la densidad (neuronas/mm ³) de neuronas principales en capas superficiales (I-III) y capas profundas (IV-VI).	157
Figura 3.24. Estudio de las neuronas que expresan Reelina en la corteza entorrinal. A-B) Inmunohistoquímica para Reelina en animales WT (A y A1) y PS1xAPP (B y B1) de 6 meses de edad. C) Estudio estereológico cuantitativo de neuronas Reelina-positivas a los 6 meses de edad. D) Estudio de la expresión del ARNm de Reelina mediante RT-PCR a 4 y 6 meses de edad.	159
Figura 3.25. Estudio de la pérdida neuronal selectiva en las capas profundas de la corteza entorrinal. Inmunohistoquímica para NeuN en la corteza entorrinal de animales WT (A-C) y PS1xAPP (D-F) de 2 (A y D), 4 (B y E) y 6 (C y F) meses de edad.	160
Figura 3.26. Estudio de la pérdida neuronal selectiva en las capas profundas de la corteza entorrinal. Inmunohistoquímica para NeuN en la corteza entorrinal de animales WT (A y B) PS1xAPP (C y D) de 12 (A y C) y 18 (B y D) meses de edad.	161
Figura 3.27. Cuantificación mediante RT-PCR del ARNm de los factores pro-supervivencia Lifeguard (A) y FAIML (B) en la corteza entorrinal de animales WT, PS1 y PS1xAPP de 4 y 6 meses de edad.	163
Figura 3.28. Inmunohistoquímica para FAIML en la corteza entorrinal lateral de animales WT (A-C) y PS1xAPP (D-F) de 2 (A y D), 6 (B y E) y 18 (C y F) meses de edad.	164
Figura 3.29. A-D) Inmunohistoquímica para Bim en la corteza entorrinal de animales WT (A y C) y PS1xAPP (B, B1, D y D1) de 4 (A y B) y 6 (C y D) meses de edad. E) Cuantificación mediante RT-PCR del ARNm para Bim en corteza entorrinal a 4 y 6 meses de edad.	166
Figura 3.30. Inmunohistoquímica para Caspasa-3 activada en la corteza entorrinal de animales WT (A) y PS1xAPP (B, B1 y B2) a 6 meses de edad.	167
Figura 3.31. Neuritas distróficas marcadas con anticuerpos para hAPP (A), SOM (B), NPY (C), Sinaptofisina (D), MAP2 (E) o Neurofilamento-160 (F) en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 6 meses de edad.	170
Figura 3.32. Presencia de neuritas distróficas inmunopositivas para AT8 en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP a 4 (A), 6 (B), 12 (C) y 18 (D) meses de edad.	171
Figura 3.33. Expresión de los niveles de ARNm para diversos marcadores sinápticos en corteza entorrinal microdiseccionada por láser de animales PS1xAPP, PS1 y WT a 4 y 6 meses de edad.	173
Figura 3.34. Inmunohistoquímica para los marcadores sinápticos VGluT1 (A y D), VGAT (B y E) y sinaptofisina (C y F) en la corteza entorrinal de animales WT (A-C) y PS1xAPP (D-F) de 6 meses de edad.	174
Figura 3.35. Inmunohistoquímica para hAPP-CTF en la corteza entorrinal de animales WT (A y D), PS1 (B y E) y PS1xAPP (C y F) de 2 (A-C) y 4 (D-F) meses de edad.	177
Figura 3.36. Inmunohistoquímica para hAPP-CTF en la corteza entorrinal de animales WT (A y D), PS1 (B y E) y PS1xAPP (C y F) de 6 (A-C) y 12 (D-F) meses de edad.	178
Figura 3.37. Inmunohistoquímica para hAPP-CTF en la corteza entorrinal de animales WT (A), PS1 (B) y PS1xAPP (C) de 18 meses de edad.	179

Figura 3.38. Expresión laminar de hAPP-CTF. Inmunofluorescencia doble para hAPP (verde) y NeuN (rojo) en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 4 meses de edad.	180
Figure 3.39. Expresión de hAPP-CTF en las neuritas distróficas. Inmunofluorescencia doble para VGAT/hAPP (A) y VGluT1/hAPP (B) en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 6 meses de edad.	181
Figura 3.40. Patrón de expresión temporal de A β extracelular en la corteza entorrinal. Inmunohistoquímica para 6E10 en animales PS1xAPP de 2 (A), 4 (B), 6 (C), 12 (D) y 18 (E) meses de edad.	184
Figura 3.41. Patrón temporal de expresión de A β 1-40 en la corteza entorrinal. Inmunohistoquímica con anti-A β 1-40 en animales PS1xAPP de 2 (A), 4 (B), 6 (C), 12 (D) y 18 (E) meses de edad.	185
Figura 3.42. Patrón temporal de expresión de A β 1-42 en la corteza entorrinal. Inmunohistoquímica con anti-A β 1-42 en animales PS1xAPP de 2 (A), 4 (B), 6 (C), 12 (D) y 18 (E) meses de edad.	186
Figura 3.43. Patrón de expresión temporal de A β oligomérico en la corteza entorrinal. Inmunohistoquímica con el anticuerpo M71/3 en animales PS1xAPP de 2 (A), 4 (B), 6 (C), 12 (D) y 18 (E) meses de edad.	187
Figura 3.44. Patrón temporal de deposición de A β fibrilar en la corteza entorrinal. Tinción fluorescente de placas con Tioflavina S en animales PS1xAPP de 2 (A), 4 (B), 6 (C), 12 (D) y 18 (E) meses de edad.	188
Figura 3.45. Patrón temporal de deposición de A β fibrilar en la corteza entorrinal. Tinción con rojo congo en secciones de animales PS1xAPP de 2 (A), 4 (B), 6(C), 12 (D) y 18 (E) meses de edad.	189
Figura 3.46. Estudio comparativo de la expresión de diversas formas de A β en la corteza entorrinal de animales transgénicos PS1xAPP a los 6 meses de edad.	190
Figura 3.47. A) Porcentaje del área entorrinal ocupada por depósitos de A β en capas superficiales (I-III) y capas profundas (IV-VI) en animales PS1xAPP desde los 2 a los 18 meses de edad. B) Curva de incremento temporal de la carga amiloide en capas superficiales y profundas de la corteza entorrinal.	193
Figura 3.48. Estudio cuantitativo del número y el tamaño de las placas de A β en las capas profundas de la corteza entorrinal de animales PS1xAPP.	194
Figura 3.49. Evolución temporal del porcentaje de placas amiloides en función de su tamaño en las capas profundas de la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP desde los 4 a los 18 meses de edad.	195
Figura 3.50. Variabilidad de la carga amiloide total (intra- y extracelular) en la corteza entorrinal entre distintos individuos PS1xAPP de 6 meses de edad.	196
Figura 3.51. Expresión temporal de A β intracelular. Inmunohistoquímica con 6E10 (A, A1, C y C1) y NU4 (B, B1, D y D1) en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 2 (A y B) y 4 (C y D) meses de edad.	198
Figura 3.52. Expresión temporal de A β intracelular. Inmunohistoquímica con 6E10 (A, A1, C y C1) y NU4 (B, B1, D y D1) en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 6 (A y B) y 12 (C y D) meses de edad.	199
Figura 3.53. Expresión temporal de A β intracelular. Inmunohistoquímica con 6E10 (A) y NU4 (B) en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 18 meses de edad.	200
Figura 3.54. Patrón de inmunorreactividad laminar diferencial para 6E10 en diversas regiones corticales de animales PS1xAPP a los 2 meses de edad: corteza visual (B), auditiva (C), perirrinal (D) y entorrinal (E).	202
Figura 3.55. Patrón de inmunorreactividad laminar diferencial para 6E10 en la corteza auditiva (A), perirrinal (B) y entorrinal (C) en animales PS1xAPP de 6 meses de edad.	203
Figura 3.56. Los anticuerpos 6E10 y hAPP-CTF marcan las mismas poblaciones neuronales. Marcaje triple 6E10/APP/DAPI en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 2 meses de edad.	206
Figura 3.57. Marcaje triple 6E10/APP/DAPI en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 4 meses de edad.	207
Figura 3.58. Inmunofluorescencia doble hAPP/NU4 en corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 4 meses de edad.	208

Figura 3.59. A) Esquema del tráfico vesicular intracelular. B1-B3) Localización subcelular de A β oligomérico en el retículo endoplásmico. Inmunofluorescencia doble GRP94/NU4 para microscopía confocal en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP a 2 meses de edad.	209
Figura 3.60. Localización subcelular de A β oligomérico en el complejo de Golgi. Inmunofluorescencia doble para microscopía confocal con marcadores del Golgi (A1 y B1) y NU4 (A2 y B2) en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 4 meses de edad. A1-A3).	210
Figura 3.61. Localización subcelular de A β oligomérico en endosomas tempranos y lisosomas. Inmunofluorescencia doble EEA1/NU4 (A1-A3) y LAMP2/NU4 (B1-B3) en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 4 meses de edad.	211
Figura 3.62. Intensificación del epítipo de A β 42 mediante el empleo de ácido fórmico. Inmunohistoquímica para A β 42 y contratinción con violeta de cresilo en animales PS1xAPP 4 (A y B) y 6 (C y D) meses de edad.	213
Figura 3.63. El A β no se acumula intracelularmente en la corteza entorrinal a edades tempranas. Inmunohistoquímica para A β 42 y contratinción con violeta de cresilo de animales PS1xAPP de la corteza entorrinal a 2 (A), 4 (B) y 6 (C) meses de edad.	214
Figura 3.64. El A β se acumula intracelularmente en el subículo (A y C) y la corteza motora (B y D). Inmunohistoquímica para A β 42 y contratinción con violeta de cresilo en animales PS1xAPP a 2 meses de edad.	215
Figura 3.65. Activación glial en la corteza entorrinal a edades tempranas. Expresión del ARNm para CD11b (A) y GFAP (B) en animales WT, PS1 y PS1xAPP de 4 y 6 meses de edad.	218
Figura 3.66. Patrón temporal de activación de la microglía en la corteza entorrinal. Inmunohistoquímica con anti-CD11b en animales PS1xAPP (A-C) y WT (D-F) de 2 (A y D), 6 (B y E) y 18 (C y F) meses de edad.	219
Figura 3.67. Activación microglial en la corteza entorrinal a edades tempranas. Inmunohistoquímica para CD11b e Iba1 en animales transgénicos PS1xAPP de 6 meses de edad.	220
Figura 3.68. Activación de la microglía interplaca en capas profundas de la corteza entorrinal. Inmunohistoquímica con anti-Iba1 contrateñida con rojo congo en animales PS1xAPP (A-C) y WT (D) de 2 (A), 4 (B) y 6 (C y D) meses de edad.	221
Figura 3.69. Localización de la microglía activada alrededor de las placas amiloides en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 6 meses de edad. Marcaje fluorescente doble para CD11b/Tioflavina S (A1-A3) y Lectina de Tomate/6E10 (B1-B3) a microscopía confocal.	222
Figura 3.70. Patrón temporal de astrogliosis en la corteza entorrinal. Inmunohistoquímica para GFAP en animales WT (A y D), PS1 (B y E) y PS1xAPP (C y F) de 2 (A-C) y 4 (D-F) meses de edad.	223
Figura 3.71. Patrón temporal de astrogliosis en la corteza entorrinal. Inmunohistoquímica para GFAP en animales WT (A y D), PS1 (B y E) y PS1xAPP (C y F) de 6 (A-C) y 18 (D-F) meses de edad.	224
Figura 3.72. Astrocitos reactivos en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 6 meses de edad. Inmunofluorescencia doble para GFAP/6E10 a microscopía confocal.	225
Figura 3.73. Activación glial en la corteza cerebral a edades tempranas. Estudio autorradiográfico con el radioligando 3H-PK11195 (PBRs) en animales WT, PS1 y PS1xAPP a 2 y 6 meses de edad.	226
Figura 3.74. Cuantificación de los niveles de ARNm para TNF α y factores relacionados, así como sus correspondientes receptores, en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP a edades tempranas. Estudio mediante RT-PCR en muestras microdiseccionadas por láser.	229
Figura 3.75. Expresión de TNF α (A-D) y su receptor TNFR1 (E-H) en corteza entorrinal. Estudio inmunohistoquímico en animales WT (A, E y G) y PS1xAPP (B-D, F y H) de 6 meses de edad.	230
Figura 3.76. Cuantificación del ARNm de enzimas implicadas en la respuesta inflamatoria iNOS (A), COX2 y NOX1 (B). Estudio en corteza entorrinal a edades tempranas.	231

Figura 3.77. Patrón de expresión temporal de iNOS en la corteza entorrinal. Estudio inmunohistoquímico en animales PS1xAPP (A-E) y WT (F) de 2 (A), 4 (B), 6 (C), 12 (D) y 18 (E y F) meses de edad.	232
Figura 3.78. La expresión de iNOS se localiza en los astrocitos en la corteza entorrinal. Inmunofluorescencia doble iNOS/GFAP a microscopía confocal en animales PS1xAPP de 6 meses de edad.	233
Figura 3.79. Fenotipo alternativo de la microglía activada que rodea las placas. A-C) Inmunohistoquímica para Ym1 en la corteza entorrinal de animales WT (A) y PS1xAPP (B y C) de 6 (A y B) y 18 (C) meses de edad. D) Marcaje fluorescente doble Ym1/Lectina de tomate para microscopía confocal en animales PS1xAPP de 6 meses de edad.	235
Figura 3.80. Actividad fagocítica de la microglía activada asociada a placas. Marcaje fluorescente doble para Lectina de tomate y 6E10 en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 6 meses de edad.	236
Figura 3.81. Expresión del factor neurotrófico IGF1 en corteza entorrinal a edades tempranas. Inmunohistoquímica para IGF1 en animales WT (A y C) y PS1xAPP (B y D-F) de 2 (A y B) y 6 (C-F) meses de edad. G) Expresión del ARNm para IGF1 a 4 y 6 meses de edad.	238
Figura 3.82. Las células microgliales alrededor de las placas expresan IGF1. Doble marcaje fluorescente para IGF1 (rojo) y lectina de tomate (verde) a microscopía confocal en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 6 meses de edad.	239
Figura 3.83. El factor neurotrófico IGF1 está presente en neuritas distróficas que contienen SOM en la corteza entorrinal. Inmunofluorescencia doble para IGF1/SOM a microscopía confocal en animales PS1xAPP de 6 meses de edad.	240
Figura 3.84. El receptor para IGF1 se expresa en núcleos neuronales y en astrocitos en la corteza entorrinal. A-D) Inmunohistoquímica para IGF1R e IGF1RP en animales PS1xAPP a 6 y 18 meses de edad. E) Inmunofluorescencia doble para IGF1R (rojo) y GFAP (verde) en animales PS1xAPP de 12 meses de edad.	241
Figura 3.85. Expresión de interleuquina 4 (IL4) en la corteza entorrinal. A-C) Inmunohistoquímica de IL4 en la corteza entorrinal de animales WT (A) y PS1xAPP (B y C) a 6 meses de edad. D-E) Inmunohistoquímica doble para CD3/IL4 y GFAP/IL4 a microscopía confocal en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 12 meses de edad.	243
Figura 3.86. Infiltración de linfocitos T en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP. Inmunohistoquímica para CD3 y tinción de rojo congo en animales PS1xAPP (A-C) y WT (D) de 6 (A), 12 (B y D) y 18 (C) meses de edad.	244
Figura 3.87. Cuantificación del ARNm de la quimioquina fractalquina. Estudio mediante RT-PCR en corteza entorrinal microdiseccionada por láser a edades tempranas (4 y 6 meses de edad).	246
Figura 3.88. Efecto neuroprotector del litio en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP. Estudio inmunohistoquímico para NeuN en animales PS1 con dieta de mantenimiento (A), PS1xAPP de mantenimiento (B) y PS1xAPP con dieta de litio (C).	247
Figura 3.89. Efecto neuroprotector del litio sobre las interneuronas SOM-positivas en la corteza entorrinal. A-C) Inmunohistoquímica para SOM en animales PS1 (A) y PS1xAPP (B) con dieta estándar (mantenimiento) y animales PS1xAPP con dieta de litio (C). D) Estudio estereológico.	249
Figura 3.90. Efecto neuroprotector del litio sobre las interneuronas NPY-positivas en la corteza entorrinal. A-C) Inmunohistoquímica para NPY en animales PS1 (A) y PS1xAPP (B) con dieta estándar (mantenimiento) y animales PS1xAPP con dieta de litio (C). D) Estudio estereológico.	250
Figura 3.91. El tratamiento con carbonato de litio no parece afectar la formación de depósitos de A β . Inmunohistoquímica para 6E10 (A y D), NU4 (B y E) y APP/rojo congo (C y F) en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP mantenimiento (A-C) y PS1xAPP tratados con litio (D-F) de 9 meses de edad.	252
Figura 3.92. El tratamiento con carbonato de litio disminuye la activación microglial interplaca en la corteza entorrinal. Estudio inmunohistoquímico para Iba1 en animales PS1 con dieta de mantenimiento (A), PS1xAPP de mantenimiento (B) y PS1xAPP con dieta de litio (C).	254

Figura 3.93. Efecto neuroprotector del litio en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP. Estudio inmunohistoquímico para iNOS en animales PS1 con dieta de mantenimiento (A), PS1xAPP de mantenimiento (B) y PS1xAPP con dieta de litio (C). 255

Figura 3.94. La administración de litio reduce la densidad de neuritas distróficas. Estudio inmunohistoquímico para AT8 en animales PS1 con dieta de mantenimiento (A), PS1xAPP de mantenimiento (B) y PS1xAPP con dieta de litio (C). 256

Abreviaturas

α 7nAChR: Subunidad alfa 7 del receptor nicotínico de acetilcolina

A β : β -amiloide

AAC: Angiopatía amiloide cerebral

ADAM: del inglés "*a disintegrin and metalloprotease*"

ADDLs: Ligandos difusibles derivados del β -amiloide

ADEVA: Análisis de la varianza

AICD: Dominio intracelular del APP

AINES: Anti-inflamatorios no esteroideos

AMCasa: Precursor de la quitinasa ácida en mamíferos

AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metilisoazol-4-propionato

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

APAF1: del inglés "*apoptosis protease-activating factor-1*"

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

Bcl-2: del inglés "*B-cell lymphoma 2*"

BHE: Barrera hematoencefálica

CA: Cuerno de Ammon

CaBP: Proteína ligadora de calcio

CB: Calbindina

CCK: Colecistoquinina

CDK: Proteín quinasa dependiente de ciclina

CE: Corteza entorrinal

ChaT: Colín acetil transferasa

COX: Ciclooxygenasa

CPA: Célula presentadora de antígeno

CR: Calretinina

CTF: Fragmento C-terminal

DAB: 3-3'-diaminobencidina tetrahidroclorídrico

DABCO: 1,4-diazabicyclo [2.2.2]-octano

DAPI: 4'-6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorhídrico

DEPC: Dietil pirocarbonato

DN: Densidad numérica

DPX: Dibutil ftalato

EA: Enfermedad de Alzheimer

EEA1: Antígeno 1 del endosoma temprano

FAD: Enfermedad de Alzheimer Familiar

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

FPR: del inglés "*formil peptide receptor*"

FS: del inglés "*fast spiking*"

GABA: Ácido gamma amino butírico

GAD: Glutamato descarboxilasa

GD: Giro dentado

GFAP: Proteína glial fibrilar ácida

GSK-3: Quinasa glucógeno sintasa 3

IAP: Inhibidor de proteínas de la apoptosis

Iba1: del inglés "*ionized calcium binding adapter molecule 1*"

IDE: Enzima degradante de insulina

IGF1: Factor de crecimiento insulínico

IGFR1: Receptor de IGF1

IHQ: Inmunohistoquímica

IL: Interleuquina

INF γ : Interferón gamma

KI: Knock-in

KO: Knock-out

LCM: Captura por microdissección láser

LDLR: Receptor de lipoproteínas de baja densidad

LEnt: Corteza entorrinal lateral

LPS: Lipopolisacáridos

LSD: Proteína de densidad post-sináptica

LT: Lectina de tomate

LTD: Depresión a largo plazo

LTP: Potenciación a largo plazo

M1: Microglía clásica

M2: Microglía alternativa

MAP2: Proteína asociada a microtúbulos 2

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

MMSE: Mini examen del estado mental

MRI: Neuroimagen de resonancia magnética

MSR: del inglés "*macrophage scavenger receptor*"

Abreviaturas

NADPH: Nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato

NeuN: Núcleos neuronales

NF: Neurofilamento

NFTs: Ovillos neurofibrilares

NMDA: Ácido N-metil-D-aspartico

NO: Óxido nítrico

NOX: NADPH oxidasa 1

iNOS: Sintasa del óxido nítrico inducible

NPY: Neuropeptido Y

PB: Tampón fosfato

PBR: Receptores de benzodiazepinas periféricos

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción de la polimerasa en cadena

PET: Tomografía de emisión de positrones

PFs: Protofibrillas

PGE2: Prostaglandina E2

PHF: Filamentos apareados helicoidales

PI3K: Fosfoinositol 3 quinasa

PLP: Paraformaldehído, L-lisina, Meta-peryodato sódico

PP: Proteín fosfatasa

PS1: Presenilina 1

PS2: Presenilina 2

PV: Parvalbúmina

RAGE: del inglés "*receptor for advanced glycation endproducts*"

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RSNP: del inglés "*regular spiking nonpyramidal*"

RT-PCR: Reacción de la polimerasa en cadena a tiempo real

SAPK: Proteín quinasa activada por estrés

sAPP α : Fracción APP alfa soluble

sAPP β : Fracción APP beta soluble

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Sistema nervioso periférico

SOD: Superóxido dismutasa

SOM: Somatostatina

SPECT: Tomografía por emisión de único fotón

TBE: Tampón tris, ácido bórico, EDTA

Tc: Linfocito T citotóxico

TCR: Receptores de células T

TGF: Factor de crecimiento transformante

TGN: del inglés "*trans Golgi network*"

Th: Linfocito T helper

Th1: Linfocito T helper pro-inflamatorio

Th2: Linfocito T helper anti-inflamatorio

TLR: del inglés "*toll like receptor*"

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa

TNFR: Receptor del factor de necrosis tumoral

TRADD: Dominio de muerte asociado al receptor TNFR1

TRAIL: Ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF

Treg: Linfocitos T reguladores

TS: Tioflavina S

UPR: Respuesta a proteínas mal plegadas (del inglés "*unfolding protein response*")

VGAT: Transportador vesicular GABA

VGLuT: Transportador vesicular de glutamato

VIP: Polipéptido intestinal vasoactivo

WT: Genotipo salvaje ("*wild type*")

Ym1: Hidrolasa murina de tipo quitinasa similar a la quitotriosidasa humana

1. Introducción

1.1. Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es el tipo de demencia más frecuente entre las personas mayores de 65 años. Fue descrita en 1907 por el neuropatólogo y psiquiatra alemán Aloïs Alzheimer (Alzheimer y col., 1907) en el artículo titulado '*Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde*' ("Sobre una enfermedad peculiar de la corteza del cerebro"). Esta descripción fue realizada en una paciente de 55 años (Auguste Deter) que murió tras sufrir durante cuatro años una pérdida progresiva de memoria, desorientación espacio-temporal, alucinaciones, paranoia, trastornos de la conducta y del lenguaje. El análisis post-mortem de su cerebro reveló la presencia de depósitos extracelulares (placas) y marañas de fibras intracelulares (ovillos), lesiones histopatológicas que aún hoy en día se usan como los principales marcadores de diagnóstico de esta enfermedad. Sin embargo, la denominación como enfermedad de Alzheimer tuvo lugar unos años después, en 1910, por el psiquiatra alemán Emil Kraepelin en la octava edición de su manual de psiquiatría (Kraepelin, 1910).

La EA es un proceso neurodegenerativo progresivo e irreversible caracterizado por la pérdida progresiva de memoria, de habilidades intelectuales y del razonamiento, presentar estado de desorientación, confusión, cambios de humor, alteración del comportamiento y disminución progresiva de la capacidad del lenguaje (Khachaturian, 1985). Estas alteraciones son debidas a daños selectivos en regiones cerebrales y circuitos neuronales implicados en estos procesos, tales como las áreas asociativas neocorticales, el hipocampo, la corteza entorrinal, la amígdala y el telencéfalo basal.

Entre los distintos tipos de demencias existentes, como son la demencia cerebrovascular, la demencia asociada al Parkinson o la demencia frontotemporal, es la demencia tipo Alzheimer la de mayor incidencia y la más común entre las personas de edad avanzada (Morishima-Kawashima e Ihara, 2002). Existen unos 600.000 enfermos diagnosticados de Alzheimer en nuestro país, aunque se estima que podrían existir unos 800.000 y, aproximadamente, unos 15 millones a nivel mundial. La EA es el tercer problema de salud más grave en los países desarrollados, detrás de los accidentes cardiovasculares y el cáncer y se calcula que en el año 2050 alrededor de 100 millones de personas en el mundo se encontrarán afectadas por el Alzheimer.

El incremento de la población de edad avanzada en los últimos años y el probable incremento en el futuro, hace que aumente progresivamente la incidencia del Alzheimer en este grupo poblacional. La ausencia de marcadores biológicos hace que el análisis neuropatológico después de la muerte sea crucial para determinar el diagnóstico definitivo de un paciente con Alzheimer.

1.1.1. Neuropatología

Los principales cambios macroscópicos característicos del cerebro de los pacientes de Alzheimer incluyen una importante atrofia cortical, con adelgazamiento de las circunvoluciones, ensanchamiento de los surcos, engrosamiento de las meninges, dilatación de las cavidades ventriculares y disminución del peso y volumen cerebral. La atrofia afecta a

Introducción

los lóbulos temporales (más frecuentemente), frontales, parietales y occipitales. El patrón de atrofia más común es el difuso, seguido por una combinación de atrofia fronto-temporal, frontal o temporal aisladas y, en menor proporción, puede haber una afectación parieto-occipital. A nivel microscópico, las principales lesiones que caracterizan la EA son:

- Depósitos extracelulares (placas seniles) formados, principalmente, por la proteína β -amiloide ($A\beta$). Estos depósitos también se encuentran en vasos sanguíneos y meninges.
- Ovillos neurofibrilares (NFTs) intracelulares formados por la proteína tau hiperfosforilada.
- Numerosas neuritas distróficas, preferentemente alrededor de las placas, y una extensa pérdida neuronal y sináptica.
- Proceso inflamatorio con activación glial (astroglía y microglía).
- Presencia de cuerpos Hirano. Inclusiones citoplasmáticas caracterizadas por la presencia de filamentos de actina y otras proteínas asociadas, entre las que se encuentra la proteína tau (Hirano, 1994).

Los cambios neuropatológicos de la EA se manifiestan en determinada áreas cerebrales vulnerables a esta patología, inicialmente en la corteza entorrinal y progresa hacia el hipocampo, implicándose finalmente las áreas neocorticales con el progreso de la enfermedad (Braak y Braak, 1991). Sin embargo, los cambios neocorticales son ya significativos cuando se diagnostica clínicamente la demencia, lo que supone un problema para la identificación de la EA en estadios tempranos, cuando los cambios neuropatológicos están limitados a las estructuras del lóbulo temporal medial. Los “fallos cognitivos moderados” o MCI (del inglés *mild cognitive impairment*) hace referencia al estado de predemencia de la EA.

Además de la afectación de la corteza entorrinal y el hipocampo, la EA cursa con pérdida neuronal en el locus cerúleo (pérdida de las conexiones noradrenérgicas con la corteza entorrinal y el hipocampo), el núcleo dorsal del rafe y el núcleo basal de Meynert (pérdida de conexiones colinérgicas) (ver revisiones Mufson y col, 2003; Heneka y O'Banion, 2007), así como la amígdala. Los ovillos neurofibrilares aparecen, preferentemente, en las neuronas principales de la corteza entorrinal, las capas II y IV de la perialocorteza límbica, el hipocampo, el subículo, la amígdala y las capas III y V de las áreas de asociación temporoparietal y frontal, mientras que apenas se localizan en la corteza motora y sensorial (Paerson y col., 1985; Arnold y col., 1991). Los estudios neuropatológicos también revelan que las neuronas principales de las capas III y V de las áreas de asociación son las que sufren un proceso neurodegenerativo selectivo (Brun y Englund, 1981). Las zonas afectadas por la EA están implicadas en los mecanismos de memoria y aprendizaje. Por el contrario, la corteza motora y sensorial no parecen estar alteradas, permaneciendo intactas las funciones en las que están implicadas incluso en los estadios más avanzados de la enfermedad.

1.1.2. Sintomatología

La progresión de la enfermedad de Alzheimer se puede dividir en tres etapas: una inicial o leve, una etapa intermedia o moderada y una etapa final avanzada o severa. Se trata de etapas que se desarrollan a lo largo de varios años de forma gradual y en las que se manifiestan los siguientes síntomas:

- Fase temprana, inicial o leve
 - Olvido de acontecimientos recientes
 - Cambos de personalidad, apatía
 - Desorientación en entornos conocidos
- Fase intermedia o moderada
 - Dificultad para tomar decisiones simples
 - Pérdida de coordinación
 - Descuido personal, incontinencia
 - Incapacidad de reconocer a familiares
 - Ansiedad e insomnio
 - Reacciones desproporcionadas y paranoia
 - Dificultad de comprensión y expresión verbal
 - Pérdida de capacidades mentales como leer, escribir o calcular
- Fase avanzada o severa
 - Pérdida completa de la memoria
 - Incapacidad de comunicarse, reconocer lugares, personas o cosas
 - Conducta agresiva y hostil
 - Incapacidad total para valerse por sí mismo (caminar, comer o asearse)

Tras la amnesia, aparecen otros desórdenes, como la afasia (pérdida de la capacidad del habla), la apraxia (alteración de los gestos ya que, aunque la función motora no se ve afectada, los pacientes son incapaces de realizar tareas rutinarias), la agnosia (incapacidad de reconocimiento de personas u objetos) y problemas en las funciones ejecutivas. Todo esto puede desembocar en cambios en la personalidad y demencia, incluyendo paranoia, alucinaciones, apatía, perturbación del sueño y depresión (Reiman y Caselli, 1999). El declive cognitivo progresa gradualmente con la enfermedad. Desde el momento en que la EA es diagnosticada, la enfermedad se prolonga durante 5 a 10 años, con un promedio de supervivencia de 8 años.

1.1.3. Tipos de Alzheimer

Se diferencian dos tipos de Alzheimer, el denominado Alzheimer familiar o FAD (del inglés *Familial Alzheimer's Disease*) y el llamado Alzheimer esporádico, según la edad de inicio, su incidencia y las causas de aparición, aunque la patología en ambos tipos curse con los mismos síntomas y lesiones histopatológicas:

1.1.3.1. Alzheimer Familiar (FAD)

Este tipo de Alzheimer (presenil o de inicio temprano) se caracteriza por su aparición entre los 35 y 40 años de edad (Rosenberg, 2000), y es debido a una transmisión de carácter autosómico dominante, constituyendo sólo el 5 % de los casos de Alzheimer. Existen múltiples genes susceptibles para la enfermedad, aunque sólo tres están directamente implicados:

- Presenilina-1 (PS1)

La mutación en este gen es la causa más común de las formas familiares de Alzheimer (Sherrington y col., 1995), conociéndose más de 50 mutaciones distintas. La mutación de este gen se encuentra en el 30-50% de los casos de EA que poseen una aparición temprana y es la principal causa de EA a partir de los 55 años (Czech y col., 2000). El gen de la PS1 se localiza en el cromosoma 14q24.3. Es una proteína integral de membrana.

- Presenilina-2 (PS2)

Posee una alta homología con la PS1. Se encuentra codificada en el cromosoma humano 1 (Rogaev y col., 1995). Para la PS2, solo se conocen un par de mutaciones de pérdida de sentido responsables de provocar la enfermedad (Czech y col. 2000).

- Proteína precursora β -amiloide (APP)

La mutación en este gen se hereda de forma autosómica dominante. Fue la primera mutación descrita relacionada con la EA, pero afecta a un bajo porcentaje de personas. El procesamiento del APP genera la producción del A β , integrante principal de las placas seniles. El gen que codifica para esta proteína se localiza en el cromosoma 21 (Goate y col., 1991). Se conocen varias mutaciones en este gen, como son la mutación denominada 'London', en la que se ve afectado el codón 717, produciéndose un cambio de valina por isoleucina (V717I) (Goate y col., 1991); y la mutación 'Swedish', en la que se produce una doble mutación en los codones 670 y 671, donde la lisina y metionina son reemplazadas por aspártico y leucina, respectivamente (Mullan y col., 1992).

1.1.3.2. Alzheimer Esporádico

Este tipo de Alzheimer (senil o de inicio tardío), presenta una incidencia baja hasta los 60-65 años de edad, afectando a un 3 ó 4% de la población. A partir de esta edad, el porcentaje de incidencia se duplica cada 5 años, lo que supone que más de la mitad de la población de 80 años puede padecer esta enfermedad. En la forma esporádica de la enfermedad, el principal factor de riesgo no es el genético, ni los factores ambientales, ya que por sí solos no son suficientes para desencadenar la enfermedad. Por lo tanto, la aparición de la enfermedad puede estar determinada por el polimorfismo existente entre los individuos, que pueden ser más o menos resistentes al proceso neurodegenerativo.

El gen de la **apolipoproteína E** o ApoE es un factor de riesgo en el desarrollo de la forma esporádica. La ApoE es una proteína de 34 KDa que posee tres isoformas distintas

denominadas $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ (la más común) y $\epsilon 4$. La ApoE es una proteína del plasma que interviene en el transporte de colesterol. Es sintetizada por los astrocitos y su síntesis se incrementa durante el desarrollo normal del cerebro y tras un daño cerebral. Además, también se sintetiza en neuronas que se cree intervienen en procesos de mantenimiento y remodelación neuronal. Los niveles de ApoE son elevados en enfermedades neurodegenerativas severas, como en la EA (Strittmatter y col., 1993; Mahley y col., 2006; Ampuero y col., 2006). Esta proteína parece estar implicada en la formación de placas amiloides y agregados neurofibrilares, al interaccionar tanto con el péptido A β como con la proteína tau. ApoE4 estimula la fosforilación de tau, provoca neurodegeneración y declive cognitivo e incrementa el depósito amiloide, entre otros efectos. Además, ApoE4 puede actuar de forma independiente al péptido amiloideo, ya que es escindida por proteasas en el interior celular, generándose fragmentos tóxicos que afectan al funcionamiento mitocondrial (Mahley y col., 2007). Se ha descrito recientemente que la ApoE4 es capaz de estimular la producción de PGE2 o prostaglandina E2, que es un factor inflamatorio producido por la microglía, lo que también contribuye a la patogénesis de la EA (Chen y col., 2005).

Por lo tanto, los genes implicados en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer pueden ser agentes causales de la misma y estar implicados en las etapas iniciales, principalmente, de los casos de Alzheimer familiar, o ser susceptibles de desencadenar la enfermedad, estando más asociados a estadios tardíos y a la forma esporádica (Rocchi y col., 2003). Un resumen de los principales genes implicados se muestra en la tabla 1.1.

Gen	Cromosoma	Etapas	Familiar o Esporádico
APP	21q21.3-q22.05	Temprana	Familiar
PS1	14q24.3	Temprana	Familiar
PS2	1q31-q42	Temprana	Familiar
APOE	19q32.2	Tardía	Familiar y esporádico
$\alpha 2M$	12p	Tardía	Esporádico
LRP	12	Tardía	Esporádico
ACE	17q23	Tardía	Esporádico
IDE	10q23-q25	Temprana y tardía	Familiar y esporádico
TGF- $\beta 1$	19q13.1-q13-3	Tardía	Esporádico

Tabla 1.1. Genes implicados en el desarrollo del Alzheimer familiar y susceptibles para la EA. APP: proteína precursora amiloide; PS1: presenilina 1; PS2: presenilina 2; APOE: apolipoproteína E; $\alpha 2M$: alfa2 macroglobulina; LRP: proteína relacionada con los receptores de lipoproteínas de baja densidad (promueve la endocitosis y proteólisis del APP); ACE: enzima convertidora de angiotensina; IDE: enzima degradadora de insulina; TGF- $\beta 1$: factor de crecimiento transformante. Tomado de Rocchi y col., 2003.

1.1.4. Factores de riesgo

Los principales factores de riesgo de la enfermedad de Alzheimer, además de los factores genéticos, son:

I. Edad o envejecimiento

Es el principal factor de riesgo. La prevalencia del Alzheimer aumenta con la edad y se duplica cada 5 años entre los 65 y 85 años (Katzman, 1976), edad a partir de la cual el aumento disminuye.

Se cree que es debido al daño producido por los radicales libres del metabolismo celular, que generan un estrés oxidativo en los lípidos y proteínas de membrana. La enfermedad se puede desarrollar cuando las células no pueden responder a los aumentos de estrés oxidativo, metabólico y/o iónico que se acumulan durante la vida de la célula, produciéndose la aglomeración de proteínas dañadas. Los determinantes de la vulnerabilidad neuronal pueden incluir el tamaño y localización celular, su metabolismo proteico y las vías de transducción de señales implicadas (Mattson y Magnus, 2006).

II. Estrés oxidativo

Es un factor de riesgo relacionado con el anterior. El estrés oxidativo es un proceso que se ve incrementado durante el envejecimiento normal y posee implicaciones importantes en el inicio, progresión y patogénesis de la enfermedad de Alzheimer, de tal forma que puede contribuir a daños en la membrana, citoesqueleto y la muerte celular. Las fuentes de especies de oxígeno reactivo que provocan daño celular son muy variadas en la enfermedad de Alzheimer (Zhu y col., 2007). Existen estudios en los que el empleo de estrategias antioxidantes previene la enfermedad de Alzheimer (Nunomura y col., 2006; Zhu y col., 2007), como son la restricción calórica, el ejercicio y la actividad intelectual.

El A β provoca incremento del estrés oxidativo y éste, a su vez, incrementa la producción de A β , ya que aumenta la actividad de la γ -secretasa. (Tamagno y col., 2008). Se cree que la agregación del A β y tau es una respuesta compensatoria al proceso oxidativo (Zhu y col., 2007).

III. Género

La mujer tiene un riesgo mayor que el hombre de padecer la enfermedad de Alzheimer (Reiman y Caselli, 1999; Ampuero y col., 2006), independientemente de su mayor longevidad. Se han propuesto factores hormonales, ya que los estrógenos disminuyen la producción de A β en cultivos celulares (Turner, 2001). Además, se conoce que los estrógenos poseen un papel neuroprotector, por lo que su pérdida con la edad en la mujer podría incrementar las probabilidades de desarrollar la enfermedad (Maccioni y col., 2001). Existe otra teoría que involucraría a las gonadotropinas, principalmente la hormona luteinizante, como uno de los factores responsables de una mayor susceptibilidad a la enfermedad cuando se encuentran a altas concentraciones (Webber y col., 2007).

Respecto al sexo masculino, los andrógenos intervienen en habilidades espaciales y fluidez verbal. Los bajos niveles están relacionados con deficiencias cognitivas, mientras que niveles altos de testosterona se relacionan con mejoras en la memoria visual y en la memoria a largo plazo. Por lo tanto, la disminución de los niveles de testosterona con la edad, también supone un factor de riesgo de desarrollar la EA en hombres de edad

avanzada. El tratamiento con testosterona potencia la ruta no amiloidogénica, por lo que provocan un descenso de los niveles de A β (Rosario y Pike, 2008).

IV. Enfermedades cardiovasculares

Se sabe que los problemas cardiovasculares como la hipertensión, la aterosclerosis, el infarto o la isquemia cerebral incrementan la probabilidad de desarrollar la EA. Las enfermedades cardiovasculares pueden desencadenar, además, demencia vascular, que es la segunda causa de demencia tras la EA. Recientemente, se ha descrito que las enfermedades cardíacas y los infartos aumentan el deterioro de las personas que padecen EA y pueden contribuir al inicio de la enfermedad (Regan y col., 2006; de la Torre, 2006).

Las placas amiloides se presentan habitualmente en zonas cercanas a los vasos sanguíneos, proceso que se denomina angiopatía amiloide cerebral (AAC). La AAC, la disrupción de la barrera hemato-encefálica y la disfunción endotelial se dan en la mayoría de casos de Alzheimer severo (Hachinski y Muñoz, 1997; Jiang y col., 2008)

V. Otras enfermedades

Existen multitud de enfermedades, además de las cardiovasculares, que están relacionadas con la probabilidad de desarrollar la EA, como son:

- La diabetes mellitus tipo II. La insulina modula directamente la plasticidad sináptica, la memoria y el aprendizaje, además de regular el metabolismo del A β y de tau (Zhu y col., 2005; Biessels y Kappelle, 2005).
- El síndrome de Down. En esta enfermedad existe una tendencia al envejecimiento prematuro (Zigman y Lott, 2007). Además, el síndrome de Down se caracteriza por la trisomía del cromosoma 21, en el que se encuentra el gen que codifica para el APP, por lo que en estos individuos existe una sobre-expresión de la proteína que genera A β tras su procesamiento (Ryoo y col., 2008).
- Procesos inflamatorios. Un ejemplo es la artritis reumatoide, proceso en el que se ven implicados factores como las interleuquinas IL1 e IL6, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), la alfa2 macroglobulina y la alfa1 antitripsina, cuyo polimorfismo puede estar implicado en el padecimiento de la enfermedad (McGeer y McGeer, 2001).

VI. Exposición a metales

El aluminio es una sustancia neurotóxica que se asocia con la aparición del Alzheimer si existe una larga exposición a aluminio monomérico orgánico en el agua de beber (Gauthier y col., 2000). Los niveles de hierro, cobre y zinc también intervienen en la neuropatología de la EA, ya que pueden interactuar con el APP y el A β mediante reacciones redox, provocando su agregación peptídica. Altos niveles de mercurio y plomo también afectan negativamente a la enfermedad (Liu y col., 2006).

VII. Dieta

Se ha demostrado que la ingesta de frutas y vegetales ayuda a retrasar o prevenir la aparición de la EA, sobre todo en aquellos pacientes con un alto riesgo de contraer la enfermedad, debido a la presencia en estos productos de vitaminas antioxidantes y polifenoles, lo que favorece la disminución de estrés oxidativo, por lo que podrían tener un papel protector en relación con la EA (Dai y col., 2006). También, la ingesta de pescado, por su gran contenido en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga que intervienen en múltiples vías como la disminución de colesterol, podría disminuir las probabilidades de desarrollar la enfermedad (Friendland, 2003). Además, el sobrepeso, la desnutrición y los altos niveles de colesterol en sangre (hipercolesterolemia) también afectan al índice de incidencia de la enfermedad.

VIII. Condiciones perinatales

La malnutrición o el padecimiento de otras enfermedades durante los periodos de desarrollo intrauterino y/o durante la infancia pueden incrementar los riesgos de padecer la EA, independientemente de los factores genéticos o medioambientales, ya que la desnutrición en estos periodos puede afectar a la tasa de proliferación neuronal y disminuir, de forma permanente, la población neuronal del individuo (Borenstein y col. 2006).

IX. Estilo de vida

Las actividades que son estimulantes, tanto a nivel físico como cognitivo, ayudan a prevenir el déficit de memoria y aprendizaje que se dan durante la EA y disminuyen las probabilidades de padecerla (Borenstein y col. 2006). La vida sedentaria provoca obesidad, hipertensión y el síndrome de resistencia a la insulina, lo que conlleva a la aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares y diabetes, factores de riesgo de la EA (Martins y col. 2006). Además, se cree que el bajo nivel educacional puede ser un factor de riesgo para la EA, ya que se tendría una menor capacidad (plasticidad) de compensar los daños cognitivos que se dan en estadios leves de la enfermedad (Reiman y Caselli, 1999). Incluso, se piensa que la exposición a la contaminación ambiental y a pesticidas (al igual que a metales) puede acrecentar la posibilidad de desarrollar la EA.

Por otro lado, la toma de medicamentos como los anti-inflamatorios no esteroideos (AINES), inhibidores de la ciclooxygenasa o COX, podrían ser beneficiosos en principio para evitar los procesos inflamatorios asociados a esta enfermedad y para prevenirla, incluso algunos, como el ibuprofeno, parecen disminuir los niveles de A β en cultivos (Kawas, 2006), aunque hoy en día se duda de esta teoría.

1.1.5. Diagnóstico y tratamiento

Debido al aumento progresivo de la población de edad avanzada y, consecuentemente, de personas que padecen Alzheimer, es prioritario disponer de una prueba diagnóstica de esta enfermedad de forma sensible, específica, no invasiva y estándar.

El **MMSE** o mini examen del estado mental es un breve cuestionario muy conocido empleado para determinar la existencia de fallos cognitivos (Folstein y col., 1975). Fue desarrollado en 1970 por un grupo de psiquiatras y ha llegado a ser el test cognitivo más ampliamente usado para determinar la existencia y el rango de las enfermedades neurológicas, aunque tiene ciertas limitaciones como la preferencia de la función cognitiva verbal a expensas de funciones ejecutivas (Bak y Mioshi, 2007). Es fácil de realizar e interpretar, pero para incrementar su valor predictivo se aconseja su corrección con la edad y el nivel escolar.

Recientemente, hace poco más de un año, el grupo de Ray y col. (2007) encontró un total de 18 **proteínas en el plasma sanguíneo** que se pueden emplear para diferenciar muestras procedentes de individuos sanos y pacientes de la EA con un 90% de exactitud, identificando a pacientes que tenían fallos cognitivos y en los que la EA se desarrolló 2-6 años después. El análisis biológico de estas proteínas, entre las que se encuentran, principalmente, quimioquinas e interleuquinas, indican la existencia de una desregulación sistémica en la hematopoyesis, la respuesta inmune, la apoptosis y el metabolismo neuronal presentes en las fases presintomáticas de la enfermedad de Alzheimer.

Otra prueba diagnóstica es el **análisis de auto-anticuerpos** contra A β como un biomarcador de la patología de Alzheimer. Existen anticuerpos contra A β en el líquido cefalorraquídeo y en el plasma de los pacientes de la EA, aunque también existen en individuos sanos, siendo las diferencias entre ambos grupos muy variadas. Algunos anticuerpos pueden formar complejos antígeno-anticuerpo, por lo que el empleo de técnicas de disociación de los complejos antígeno-anticuerpo permite encontrar diferencias en los anticuerpos séricos para A β entre los pacientes de EA y los sujetos control (Gustaw y col., 2008).

Hasta hace unos años, el papel de la **neuroimagen** en el diagnóstico y tratamiento de la EA se reducía a descartar otras lesiones cerebrales que pudieran causar demencia progresiva, como son los tumores de lóbulo frontal o temporal. Sin embargo, actualmente se está empleando para otros fines. La neuroimagen se está comenzando a utilizar para el diagnóstico presintomático de la EA. Además, con estas técnicas es posible observar las alteraciones que se producen en distintas regiones del cerebro y el desarrollo secuencial de síntomas en enfermedades neurodegenerativas, examinando el papel específico de determinadas estructuras cerebrales implicadas en la memoria. Existen dos tipos de neuroimagen:

- Neuroimagen funcional. Es más sensible y específica para detectar alteraciones tempranas de la EA. Se emplea para el estudio de cambios en el metabolismo u oxigenación sanguínea asociados a la EA y para el estudio de compuestos químicos o genes, su existencia y distribución, que puedan estar alterados en la enfermedad de Alzheimer. Se diferencian en:
 - PET: La tomografía por emisión de positrones (*positron emission tomography*) permite determinar la distribución regional de múltiples marcadores biológicos, como son actividades enzimáticas, procesos sinápticos, hormonas, medicamentos o anticuerpos (Phelps, 1991, 2000a y b).

Introducción

- **SPECT**: Tomografía por emisión de un único fotón (*single photon emission computed tomography*). Esta técnica permite conocer, por ejemplo, las zonas de hipoperfusión cerebral mediante la administración de un trazador. El grupo de Johnson y col, en 1998, pudo comprobar que en los pacientes de EA la perfusión de la corteza parietotemporal, el hipocampo y el giro cingulado estaba disminuida en comparación con los controles.
- **fMRI**: Neuroimagen de resonancia magnética funcional (*functional magnetic resonance imaging*). Permite conocer las zonas de activación neuronal relacionadas con las funciones cognitivas y esto se puede relacionar con las zonas cerebrales que sufren atrofia en los pacientes de la EA (Johnson y col, 2000).
- **Neuroimagen estructural**. Permite predecir, en personas con trastornos de memoria, la probabilidad de evolucionar hacia una demencia.
 - **MRI**: Neuroimagen de resonancia magnética (*magnetic resonance imaging*). Actualmente, el MRI de alta resolución es una herramienta única para examinar las alteraciones de la anatomía cerebral *in vivo* tanto durante el envejecimiento normal como en varias enfermedades relacionadas con la edad, como es la enfermedad de Alzheimer. Esta técnica permite conocer la existencia de atrofia tanto en la corteza entorrinal como en el hipocampo en estadios tempranos de la EA (Bobinski y col., 1999, De Toledo Morrell y col., 2000; Du y col., 2001; Du y col., 2003; De Toledo Morrell y col., 2004; Du y col., 2004).

Hoy en día no existe tratamiento farmacológico eficaz para corregir la sintomatología propia de la enfermedad de Alzheimer y, aún menos, ningún tratamiento o terapia que evite o retrase su aparición o su desarrollo. Las estrategias de tratamiento se han centrado en la prevención de la producción de A β , su agregación, su toxicidad o su degradación, o bien, una combinación de éstas. Esto incluye inhibidores de la γ -secretasa y el empleo de AINES, que reducen la producción de A β ; las estatinas para disminuir el colesterol; la neprilisina, para promover la degradación del A β y quelantes de metales para bloquear la agregación del A β , además de agentes que promuevan su eliminación (Tabla 1.2).

Tipo de tratamiento	Diana	Efectos positivos	Efectos negativos
Inhibidores de la β -secretasa	Disminución de la síntesis de A β .	Los animales BACE _{KO} son normales.	Se desconocen.
Inhibidores de la γ -secretasa	Disminución de la síntesis de A β .	Los inhibidores de la γ -secretasa disminuyen los niveles de A β en modelos animales de la EA.	La inhibición de la señalización de Notch puede afectar a la hematopoyesis y diferenciación linfocitaria.
Activadores de enzimas degradantes de A β	Incremento de la degradación y eliminación de A β .	Demostración in vivo de que la deficiencia en neprilisina provoca niveles más altos de A β .	No está claro si se puede realizar farmacológicamente.
Quelantes de metales	Solubilización de los depósitos de A β y prevención de la formación de agregados.	En modelos animales de EA los quelantes disminuyen el área de las placas amiloides y mejoran la salud general.	Un incremento de A β soluble puede incrementar el daño cerebral. Provoca deficiencia de vitamina B12.

Vacunación con A β	Respuesta inmune contra el péptido A β .	En modelos animales de la EA la vacunación disminuye el área de las placas y el total de A β y mejora la función cognitiva.	Riesgo de autoinmunidad e inflamación neuronal. Los anticuerpos no atraviesan la BHE en humanos como en ratones. La respuesta inmune puede no ser eficiente en personas mayores.
Estatinas	Disminución de la producción de A β al reducir los niveles de colesterol (no se conoce el mecanismo).	Reduce el riesgo de desarrollar EA en pacientes tratados con estatinas. Las estatinas reducen la carga amiloide en el cerebro de ratones y cobayas.	Se desconocen.
AINES	Disminuye la inflamación cerebral que provoca muerte neuronal. Inhibe la generación de A β_{42} .	Reduce el riesgo de desarrollar EA en pacientes tratados con AINES.	Efectos secundarios en el tracto gastrointestinal cuando el tratamiento es muy prolongado.

Tabla 1.2. Resumen de estrategia anti-amiloide para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. En la tabla se muestra el tipo de droga que se emplea, la diana terapéutica y los argumentos a favor y en contra de cada una de las terapias. Modificado de Dominguez y DeStrooper, 2004.

Sin embargo, existen estudios contrarios a la eficacia del empleo de algunas de estas terapias, como el empleo de los **AINES** en la prevención del desarrollo de la EA (Aisen y col., 2003), ya que otras drogas anti-inflamatorias, como la hidroxiclороquina o la prednisona no poseen efectos protectores, por lo que la supresión del proceso inflamatorio no es la única cuestión implicada. Además, los AINES poseen como diana las enzimas COX1 y 2, pero los inhibidores específicos de COX2 apenas muestran un efecto protector en las pruebas clínicas (ver revisión Dominguez y DeStrooper, 2004).

Por el momento, la eliminación de A β a través de estrategias de **inmunización** activa y pasiva en modelos animales permite disminuir sus niveles y mejorar las pruebas de comportamiento. Esta aproximación se trasladó a estudios clínicos, realizando una inmunización periférica con una vacuna con A β_{42} . Desafortunadamente, se detuvo el estudio en la fase II por la aparición de meningoencefalitis en los pacientes (Forman y col., 2004).

El **litio** es un fármaco efectivo y bien tolerado empleado para la prevención y el tratamiento agudo de desórdenes bipolares, que ya ha sido probado previamente para el tratamiento de pacientes de Alzheimer con resultados controvertidos. Sin embargo, se piensa que el litio podría emplearse para la prevención del Alzheimer en casos de riesgo de Alzheimer familiar (Yeh y Tsai, 2008).

En estudios *in vitro*, el litio es capaz de inhibir la secreción del péptido A β en células transfectadas con APP (Sun y col., 2002) e inhibir la hiperfosforilación de tau en neuronas, por lo que el tratamiento con litio podría ralentizar la fosforilación de tau en pacientes de Alzheimer (Muñoz-Montaña y col., 1997). Por otro lado, el litio es capaz de inhibir parcialmente a la GSK3, dentro del rango terapéutico (Jope, 2003). Además, la prevalencia de Alzheimer en pacientes con tratamiento crónico de litio (con desorden bipolar) es menor que en individuos que no han sido recientemente tratados con litio, por lo que el litio tendría

un efecto protector contra el Alzheimer (Nunes y col., 2007). Incluso, se ha observado que el litio es capaz de incrementar la actividad del BDNF o factor neurotrófico cerebral, que reduce los niveles de depresión y estrés, considerados factores de riesgo de la EA (Fukumoto y col., 2001).

Por lo tanto, el litio podría emplearse potencialmente para la prevención de la EA. Sin embargo, aunque el litio reduce la fosforilación de tau, no disminuye los niveles de A β o los fallos de memoria de trabajo en el animal triple transgénico (Caccamo y col., 2007). En estos estudios la administración de litio se realizó en animales adultos y no jóvenes, cuando la neurodegeneración aún puede ser reversible.

Actualmente, la terapia más comúnmente administrada para la EA se centra en el uso de:

- Moduladores de los receptores glutamatérgicos ácido N-metil-D-aspartico (NMDA): La descarga excesiva de glutamato está relacionada con procesos neurodegenerativos (excitotoxicidad del glutamato y posterior desequilibrio de la homeostasis del calcio) en trastornos tanto agudos (isquemia) como crónicos (EA). El clorhidrato de memantina es un fármaco anti-demencia antagonista no competitivo del receptor NMDA y actúa como modulador de la transmisión glutamatérgica (Reisberg y col., 2003).
- Inhibidores de la acetilcolinesterasa: En personas de avanzada edad y en pacientes con demencia existen disfunciones colinérgicas importantes en el SNC, relacionadas con la pérdida de memoria (Bartus y col., 1982). El déficit colinérgico provoca fallos cognitivos importantes en la enfermedad de Alzheimer. Los inhibidores para la acetilcolinesterasa reducen la degradación de acetilcolina, mejorando la transmisión colinérgica y mejorando los síntomas de la EA durante un periodo de tiempo limitado, ya que ya que en fases avanzadas de la EA no tienen efectos sobre los síntomas (ver revisión Krall y col., 1999).

1.2. Péptido β -amiloide

1.2.1. La proteína precursora amiloide (APP)

El APP (del inglés *amyloid precursor protein*) es una glicoproteína integral de membrana tipo I cuyo procesamiento proteolítico origina, mediante la acción de la γ - y β -secretasas, péptidos solubles A β (de 4 KDa), que circulan en baja concentración tanto en sangre como en el líquido cefalorraquídeo. Posee un largo dominio extracelular N-terminal globular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular corto. Consta de 18 exones, que pueden generar tras su procesamiento 10 isoformas alternativas.

Posee dominios funcionales que se unen a heparina, colágeno, laminina e iones Cu²⁺ y Zn²⁺ (Fig. 1.1), lo que permite interacciones con la matriz extracelular, además de mediar en el crecimiento de neuritas, interacciones célula-célula y la adhesión celular (Evin y Weidemann, 2002). La región que formará el β -amiloide tras el procesamiento del APP se

encuentra tanto en el dominio extracelular como en el transmembrana, provocando que el A β tenga propiedades de agregación, ya que una parte de la molécula tiene características hidrofóbicas.

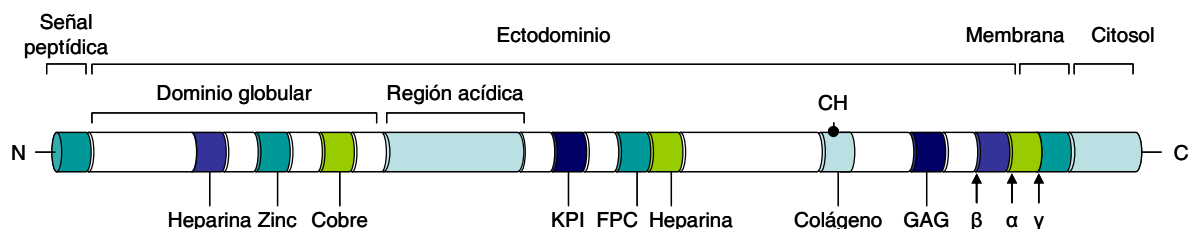


Figura 1.1. Esquema de la estructura del APP. Esta proteína contiene numerosos sitios de unión a moléculas propias de la matriz extracelular, como la heparina o el colágeno. En la zona C-terminal entre el dominio de membrana y el ectodominio, se encuentra la zona de corte de las secretasas α , β y γ que generarán la escisión del péptido A β . KPI: inhibidor de la serín proteasa Kunitz; FPC: factor promotor de crecimiento; CH: sitio de unión a carbohidratos; GAG: sitio de unión de glucosaminoglucanos. Modificado de Evin y Weidemaann, 2002.

Su función fisiológica se desconoce hasta el momento, ya que los animales transgénicos que carecen de este gen no muestran ninguna sintomatología, debido, posiblemente, a la existencia de moléculas homólogas que suplirían su papel, como la APLP1 y APLP2 (*amyloid precursor-like protein*), que pertenecen a la misma familia proteica (Walsh y col., 2007). Existen evidencias de que el APP podría estar implicado en el crecimiento de neuritas y del cono neuronal, la migración neuronal, la homeostasis del cobre, la potenciación a largo plazo (LTP) y la señalización intracelular (Hoe y Rebeck, 2008). Se ha descrito que el APP puede tener un papel neuroprotector como antioxidante, ya que es capaz de reducir el Cu^{2+} a Cu^{+} (Evin y Weidemann, 2002). Las mutaciones de APP pueden no provocar la pérdida de estas funciones en el organismo, pero sí aumentar la función tóxica, ya que incrementan la producción de fragmentos de β -amiloide que son potencialmente citotóxicos (Selkoe, 2001).

A continuación, se muestra la secuencia peptídica del APP en la región que genera la molécula de A β , así como los aminoácidos que se ven implicados en algunas de las mutaciones genéticas que provocan la aparición del Alzheimer familiar. También se muestran los sitios de corte o procesamiento de las secretasas sobre el APP (Fig. 1.2):

Introducción

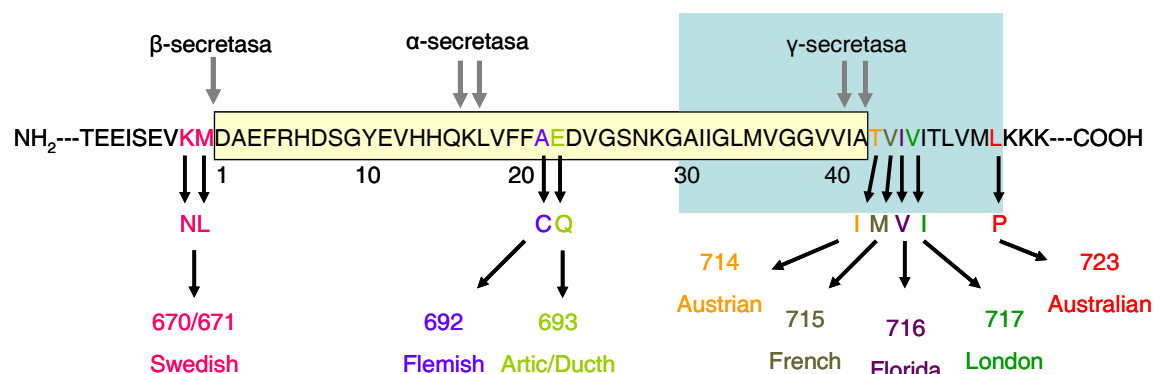


Figura 1.2. Esquema de la secuencia peptídica del APP, las mutaciones familiares y sitios de procesamiento. La secuencia del A β está encuadrada en la caja de color amarillo claro. El rectángulo celeste delimita el dominio de membrana. Las flechas de arriba indican la zona de corte de las secretasas, mientras que la flecha discontinua indica la zona de escisión que genera el péptido amiloide insoluble. Las mutaciones puntuales que se han encontrado en casos de EA familiar están destacadas en color. Modificado de Evin y Weidemaann, 2002.

1.2.2. Procesamiento del APP y generación del β -amiloide

Durante el envejecimiento normal y de forma más acusada en la enfermedad de Alzheimer, se originan péptidos A β tóxicos insolubles (A β_{1-42}), que formarán las placas amiloides o seniles a partir del procesamiento del APP. Además, se generan múltiples moléculas a las que se les han atribuido una gran variedad de funciones. Existen dos vías alternativas de procesamiento post-traducciona del APP, la vía no amiloidogénica, que no genera A β y se considera la vía principal, y la vía amiloidogénica, en la que se forman A β_{1-40} y A β_{1-42} .

1.2.2.1. Ruta no amiloidogénica

Esta es la ruta de procesamiento del APP predominante y forma parte de la vía secretora normal de las células. Se denomina así porque la proteólisis se produce dentro de la región que da lugar al A β , entre los aminoácidos 16 y 17, por lo que se evita su producción.

En esta ruta se produce la fragmentación del APP tras el residuo 687 por la acción proteolítica de la α -secretasa que está anclada a la membrana, generando sAPP α , que es un fragmento soluble que se libera dentro del lumen vesicular o al espacio extracelular. A este fragmento se le atribuyen propiedades neuroprotectoras, neurotróficas y sinaptogénicas (Mattson y col, 1993). Además, se genera un fragmento C-terminal o CTF de 83 aminoácidos, denominado C83, que queda unido a la membrana.

Un tipo de α -secretasa que podría estar implicada en la ruta no amiloidogénica es la desintegrina metaloproteasa ADAM10 (del inglés *A Disintegrin And Metalloprotease*) (Kojro y col., 2001). La α -secretasa puede regularse a través de la activación de la proteína-quinasa C, así como de neurotransmisores, factores de crecimiento, citoquinas y hormonas. Una de

estas hormonas son los estrógenos, que pueden activar la acción de la α -secretasa y reducir así los niveles de las formas tóxicas de A β (Xu y col., 1998; Evin y Weidemann, 2002).

Posteriormente, el fragmento C83 es sustrato de la γ -secretasa. Se trata de un complejo enzimático del que forma parte la presenilina, que actúa dentro de la membrana contando en el residuo 711 ó 713, dando lugar a los péptidos p3 (péptido de 3 KDa que puede encontrarse formando parte de las placas) y AICD o dominio intracelular del APP (del inglés *APP intracellular domain*), que es citosólico, por lo que podría tener una función en la regulación de la transcripción génica (Fig. 1.3). Sin embargo, no todos los fragmentos CTFs son procesados, ya que algunos son degradados en endosomas tardíos o en lisosomas (ver revisiones Selkoe, 2001 y 2008).

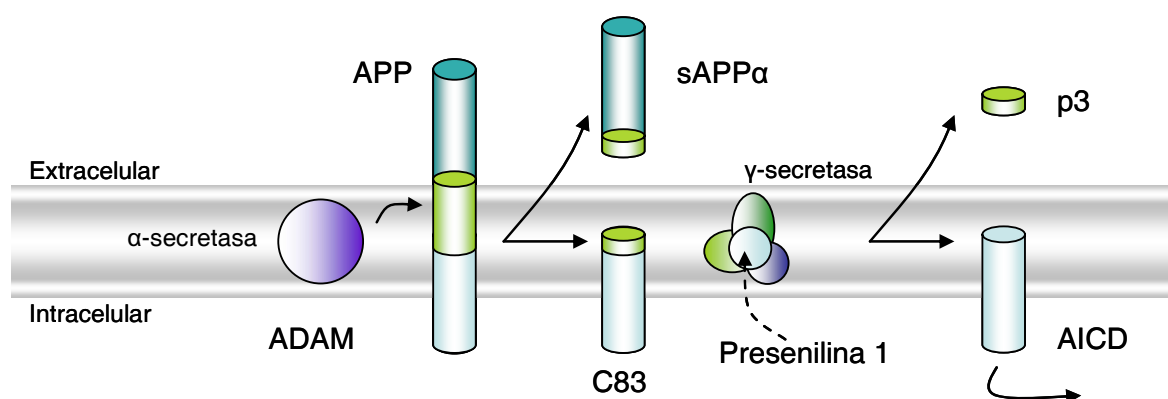


Figura 1.3. Esquema de la vía no amiloidogénica. El metabolismo del APP se da principalmente en la membrana plasmática, aunque también en compartimentos celulares, mediante el procesamiento proteolítico secuencial de la α - y γ -secretasa, que generan sAPP α , p3 y AICD.

1.2.2.2. 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 . La producción de β -amiloide no es únicamente un proceso patológico, sino que se produce de forma normal y se detecta tanto en el plasma como en el fluido cerebroespinal de individuos sanos.

Esta vía se inicia con la acción de la actividad β -secretasa presente en la enzima BACE o BACE1 (enzima de corte del APP en el lugar β) que es una aspartil proteasa transmembrana tipo I, presente principalmente en las células neuronales, específicamente en los compartimentos donde se produce el A β , como los endosomas y el aparato de Golgi, ya que requiere para su actividad un pH ácido como el que existe en el lumen de estos compartimentos. La ablación del gen de BACE en animales transgénicos no provoca modificaciones en el desarrollo o supervivencia de los individuos, pero sí es necesario para la formación del A β (Cai y col., 2001; Luo y col., 2001), ya que su inhibición reduce la producción de A β endógeno, incluso en animales no transgénicos (Nishitomi y col., 2006). La homóloga BACE2 se encuentra, principalmente, en el tejido cardíaco y vascular, por lo que estaría implicada en el A β vascular.

La β -secretasa fragmenta el APP tras el residuo 671 en sAPP β (que es más pequeño que el sAPP α) y el péptido C99 (CTF de 99 residuos), que permanece unido a la membrana y que contiene la secuencia completa del β -amiloide intacta. C99 es sustrato de la γ -secretasa, que libera el β -amiloide de 40 ó 42 aminoácidos y el AICD (Fig. 1.4) (ver revisiones Selkoe, 2001 y 2008).

Normalmente, el péptido acaba en Val₄₀ (A β ₄₀) en el extremo C-terminal, pero un pequeño porcentaje lo hace en Ala₄₂ (A β ₄₂), lo que hace que sea un péptido más hidrofóbico, por lo que tiende a agregarse y formar fibrillas. La formación de los fragmentos A β ₄₀ o A β ₄₂ es debido a que el sitio de procesamiento sobre el que actúa la γ -secretasa no tiene una secuencia específica. A β ₄₀ es el péptido más frecuente y es soluble en agua, mientras que la isoforma A β ₄₂ sólo constituye un 10% del β -amiloide total en los animales estudiados, pero es la forma más tóxica.

Las mutaciones que se producen en el Alzheimer familiar, afectan a los genes de las presenilinas y al APP, lo que provoca una modificación en su procesamiento y un incremento en la producción de la forma tóxica A β ₄₂. Estos péptidos se agregan formando protofilamentos, que se acumularán en el espacio extracelular, generando las placas seniles (Evin y Weidemann, 2002).

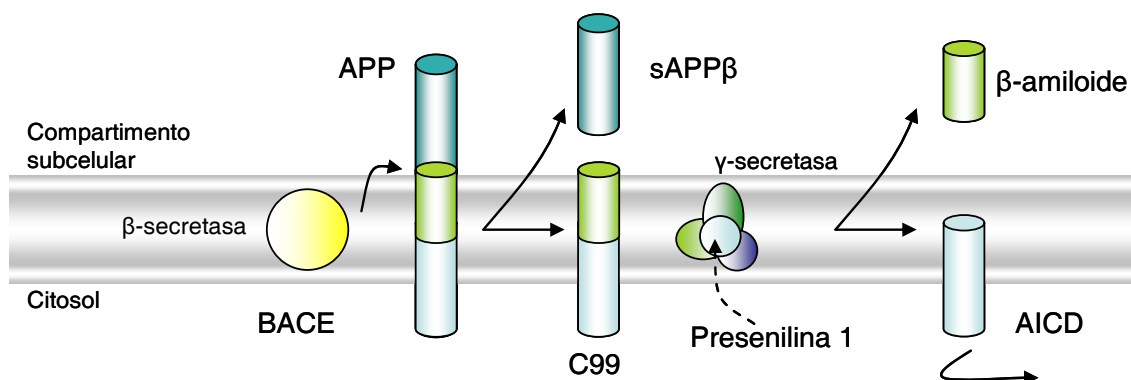


Figura 1.4. Esquema de la vía amiloidogénica. El metabolismo del APP puede tener una ruta alternativa mediante la actuación alternativa de la β -secretasa (BACE) y el posterior procesamiento por la γ -secretasa, generando sAPP β , A β (fragmento en verde) y AICD. Este procesamiento se da, principalmente, en la membrana de los compartimentos subcelulares.

1.2.3. Presenilina 1 y Presenilina 2

Tanto la presenilina 1 como la presenilina 2 (PS1 y PS2, respectivamente) son proteínas integrales de membrana con 6-9 dominios transmembranales y los dominios N- y C-terminal citosólicos. Poseen un lazo hidrofílico citoplasmático entre el dominio 6 y el 7. Se encuentran ubicadas en el retículo endoplásmico, en el aparato de Golgi, lisosomas, endosomas, fagosomas, mitocondrias y también se han detectado en la membrana plasmática (Vetrivel y col., 2006). Forman parte un complejo proteico denominado secretasoma, con actividad γ -secretasa.

Las proteínas PS1 y PS2 son altamente expresadas en el hipocampo, la corteza entorrinal y el subículo (Lee y col., 1996), aunque también aparecen en otras zonas del cerebro y en tejidos periféricos. Entre ambas proteínas existe un 65% de homología, siendo la PS1 la que se expresa en mayor cantidad. Se les atribuyen varias funciones, como 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 el procesamiento del APP, mediante un mecanismo que se verá a continuación. Además del APP, poseen otros sustratos, como son los homólogos del APP (APLP1 y APLP2), Noch y sus homólogos, el receptor de la tirosín quinasa ErbB-4, proteínas de adhesión celular y un largo etcétera (ver revisión de Vetrivel y col., 2006).

Las mutaciones asociadas a los genes de PS1 y PS2 son autosómicas dominantes y altamente penetrantes, provocando un incremento en la producción de $A\beta_{42}$ ya que son las presenilinas las que contienen el sitio activo de la actividad γ -secretasa, generando la formación de los fragmentos insolubles que se acumulan en forma de placas seniles. De hecho, los animales a los que se les ha eliminado el gen de la presenilina, poseen una reducción del 80% en la actividad de la γ -secretasa. Además, estos animales *knockout* (KO) para el gen de la presenilina presentan una acumulación de sus sustratos (De Strooper y col., 1998).

El secretasoma es un complejo proteico multimérico de alto peso molecular con actividad γ -secretasa formado por la presenilina asociada a nicastrina (glicoproteína de membrana, también denominada APH-2), APH-1 (proteína transmembrana) y PEN-2. Primero se forma un complejo APH-1/nicastrina. A continuación, se une PS1 por el extremo C-terminal y finalmente se une PEN-2, produciéndose una endoproteólisis en PS1 en la zona del lazo hidrofílico. Se cree que PS1 es el centro catalítico del complejo (Van Gassen y Annaert, 2003; Selkoe y Wolfe, 2007).

1.2.4. Degradación del β -amiloide

Para la degradación metabólica de los péptidos de $A\beta$ existen distintos tipos de proteasas, capaces de degradar las formas monoméricas, oligoméricas y/o fibrilares.

La **neprilisina** o encefalinasa es una zinc-metaloproteasa capaz de hidrolizar péptidos circulantes. Es una endopeptidasa que se encuentra anclada en la membrana de la superficie celular y es capaz de eliminar el β -amiloide insoluble asociado a la membrana. Los animales que carecen de esta enzima sufren acumulación del péptido $A\beta_{42}$ en el cerebro (Iwata y col., 2001). Además, se sabe que los niveles de neprilisina, disminuyen durante el envejecimiento (Farris y col., 2007). La disminución de los niveles de neprilisina genera un aumento de $A\beta$, lo que puede provocar la inactivación oxidativa de la neprilisina, creando un círculo vicioso que conlleva una alta acumulación de amiloide en el cerebro (Hama y Saido, 2005). La neprilisina es capaz de degradar formas monoméricas y oligoméricas del $A\beta$.

La **enzima degradante de insulina** o IDE es una tiol metaloproteasa que reconoce sustratos con estructura en hoja β -plegada. Aparece como una proteína soluble citosólica que puede aparecer tanto en la superficie celular como en membranas intracelulares e

incluso ser transportada hasta el espacio extracelular. Es capaz de degradar A β en su estado monomérico, pero no cuando éste se agrega y pasa a formar fibrillas insolubles. Los péptidos formados tras la degradación no tienden a agregarse en forma de oligómeros, por lo que los productos de la degradación no son tóxicos. In vitro, la IDE puede degradar tanto la forma A β_{40} como A β_{42} , interviniendo en el mecanismo catabólico, al cortar los péptidos en varios sitios distintos (Chesneau y col., 2000).

1.2.5. Tipos de depósitos extracelulares de β -amiloide

Las placas amiloideas o seniles son agregados proteicos extracelulares formados, principalmente, por el péptido A β que se deposita tanto en el parénquima cerebral como en la pared de los vasos sanguíneos cerebrales. Además, aparecen otros componentes, como son proteoglucanos, moléculas inflamatorias, moléculas séricas, iones metálicos, moléculas amiloidogénicas (como ApoE), proteasas, proteínas de defensa antioxidante (como SOD-1 y SOD-2) y colinesterasas (Atwood, 2002).

Los depósitos de A β se dividen en placas neuríticas y placas difusas (Dickson, 1997; Sasaki y col., 1997; Armstrong, 2006; Selkoe, 2001):

1.2.5.1. Placas neuríticas

Son depósitos extracelulares de aspecto filamentosos formados principalmente por fibrillas de A β_{42} , además de la forma A β_{40} . Aparecen neuritas distróficas (inmunopositivas para tau) y células de la microglía asociadas a estas placas, mientras que la astrogliosis se localiza en la periferia. El tiempo de formación de este tipo de placas es desconocido, ya que pueden formarse gradualmente durante un largo periodo de tiempo, incluso años. Su tamaño oscila entre 10 y 120 μ m, mientras que la densidad es muy variable. Algunos autores las subdividen en placas primitivas (esféricas y sin núcleo compacto) que aparecen en zonas cercanas a los axones y las sinapsis, y placas clásicas (núcleo amiloide denso, redondo y compacto y un halo alrededor) que se asocian espacialmente a los vasos sanguíneos.

1.2.5.2. Placas difusas

Son depósitos extracelulares no fibrilares, también denominados placas preamiloides. Son zonas difusas o amorfas sin núcleo compacto, con poca o ninguna microglía y no suelen poseer neuritas distróficas ni astrogliosis. Suelen aparecer en zonas cercanas a neuronas. Están compuestas por A β_{42} y un poco o nada de A β_{40} .

1.2.6. Acumulación intracelular de β -amiloide

En principio, el A β fue identificado formando parte de las placas amiloideas extracelulares. Fue en los años 80 cuando se identificó por primera vez su existencia en el

interior celular y se determinó que esta expresión no era dependiente de la edad y que este depósito solía estar ligado a los ovillos neurofibrilares. Estudios más recientes han determinado que el amiloide intracelular corresponde a $A\beta_{42}$ y no al $A\beta_{40}$. Han surgido muchos rechazos a este descubrimiento, ya que es posible que los anticuerpos empleados pudieran reconocer la molécula de APP o sus derivados. El depósito intracelular de $A\beta$ se produce, principalmente, en las células piramidales del hipocampo y la corteza entorrinal, que son las regiones con afecciones patológicas más evidentes.

La acumulación de $A\beta$ intracelular puede tratarse de un acontecimiento temprano en la patogénesis de la EA, ya que aparece en el hipocampo y la corteza entorrinal de pacientes con defectos cognitivos leves, propensos a la EA y en modelos animales transgénicos de la EA. Además, los niveles intraneuronales parecen descender con la formación de las placas extracelulares. Esta acumulación de amiloide intracelular se da incluso en individuos sanos (ver revisión LaFerla y col., 2007). También, es posible encontrar $A\beta$ en el interior de células microgliales, ya que forman parte del sistema regulador fagocítico que intenta controlar los depósitos extracelulares, mientras que en las neuronas la función sería diferente.

El $A\beta$ puede acumularse de forma intracelular por dos motivos, uno de ellos es que una vez sintetizado, no sea secretado y, el segundo, que tras ser secretado al exterior sea, posteriormente, recaptado hacia el interior celular. Como se ha mencionado anteriormente, el APP puede estar en la membrana plasmática, en la red trans del Golgi, en el retículo endoplásmico, los lisosomas o la membrana mitocondrial, por lo que el $A\beta$ puede formarse en cualquiera de los compartimentos celulares y quedarse en el interior celular o salir al exterior si se forma en la membrana celular o en la ruta secretora, que parece ser la vía predominante. Por otro lado, 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. Podría ser que el $A\beta_{40}$ se genere en la red trans Golgi, mientras que el $A\beta_{42}$ se produzca en el retículo endoplásmico y en compartimentos del Golgi, ya que si se produce una retención del APP en el retículo endoplásmico existe una reducción del $A\beta_{40}$, pero los niveles de $A\beta_{42}$ no varían (Wirhys y col., 2004).

También cabe la posibilidad de que el $A\beta$ secretado sea recaptado por la célula, ya que se han identificado transportadores específicos, como la subunidad alfa 7 del receptor nicotínico de acetilcolina ($\alpha 7nAChR$), que posee alta afinidad por el $A\beta$ y se internaliza tras su unión (Wang y col., 2000). El receptor de ApoE, denominado LDLR (receptor de lipoproteínas de baja densidad), también contribuye a la internalización del $A\beta$, así como los receptores NMDA. Es posible que exista un balance entre el amiloide intracelular y el extracelular, ya que la eliminación de $A\beta$ extracelular con inmunoterapia reduce la cantidad de amiloide intracelular (Oddo y col., 2005). Otros estudios demuestran que al aumentar la disfunción cognitiva y el depósito de placas se atenúa la inmunorreactividad intraneuronal del $A\beta_{42}$ (Gouras y col., 2000). Diversos autores han demostrado que la aparición de amiloide intraneuronal precede a la formación de filamentos pareados helicoidales formados

por la proteína tau hiperfosforilada, ya que el A β intracelular puede afectar a la función mitocondrial y de los proteosomas, aumentando los niveles de calcio intracelulares y provocando una disfunción sináptica, lo que facilita la hiperfosforilación de tau (ver revisión LaFerla y col., 2007).

1.2.7. Formas oligoméricas de β -amiloide

Hasta hace una década, la enfermedad de Alzheimer se caracterizaba principalmente por la formación de fibras insolubles de A β que se depositaban extracelularmente, formando las placas seniles, motivo por el cual se generó la hipótesis de la cascada amiloide. Sin embargo, hoy en día se piensa que las placas amiloides no son el principal agente causal de los problemas sinápticos o la pérdida neuronal, ya que no siempre el número de placas amiloides se correlaciona bien con la severidad de la patología. Se ha descrito la existencia de formas tóxicas solubles de A β oligomérico capaces de generar estos daños. Estas formas son capaces de difundir por el parénquima cerebral, provocando pérdida sináptica y fallos cognitivos severos correlacionados con los niveles de A β soluble. Los grandes agregados insolubles amiloides parecen estar rodeados por un gran número de oligómeros más pequeños y difusibles, por lo que ambos tipos de amiloide podrían estar implicados en los daños neuronales y las disfunciones sinápticas, aunque actualmente se cree que las formas oligoméricas solubles, más pequeñas y difusibles serían las causantes de los daños más tempranos de la EA, incluso en momentos pre-sintomáticos (Haass y Selkoe, 2007).

Existen multitud de tipos de amiloide oligomérico soluble, como son las protofibrillas (PFs), estructuras anulares, paranúcleos, ligandos difusibles derivados del A β (ADDLs), globulómeros y fibrillas amiloides. En general, los oligómeros solubles se definen como las uniones de A β que se mantienen solubles en un medio acuoso (fluidos fisiológicos) aún incluso tras un centrifugado de alta velocidad, aunque no todos los oligómeros cumplen esta definición, ya que pueden unirse a otras macromoléculas o membranas celulares y hacerse insolubles.

Las **PFs** son intermediarios flexibles producidos durante la formación del amiloide fibrilar que pueden polimerizar a fibras o despolimerizarse a oligómeros más pequeños. Su tamaño oscila entre los 150 nm de longitud y 5 nm de ancho, con una estructura en hoja β plegada (Walsh y col., 1997). Las **estructuras anulares** tienen forma de rosca, con un diámetro exterior de 8-12 nm y uno interior de 2 nm, distinguibles de los anteriores mediante microscopía electrónica de alta resolución (Lambert y col., 1998). Los **ADDLs** son más pequeños que los anteriores y han sido obtenidos de pacientes de Alzheimer en muestras post-mortem. Además, los niveles de ADDLs se correlacionan bien con los fallos cognitivos. Se trata de hexámeros, octámeros y dodecámeros (Lambert y col., 1998). El **A β *56** se trata de una forma natural dodecamérica encontrada en animales transgénicos APP, cuya estructura no ha podido ser comparada con los ADDLs (Lesné y col., 2006). A β *56 puede afectar a la función sináptica y, por lo tanto a la memoria. Además, en cultivos se han

descrito formas mono-, di- y triméricas intracelulares y solubles secretadas (Walsh y col., 2000).

Hoy en día se conoce que los ADDLs y los oligómeros solubles de bajo número pueden inhibir el mantenimiento de la LTP en el hipocampo e intervenir de forma rápida y reversible en la memoria. Además, los oligómeros solubles de A β pueden interferir en la señalización de receptores como NMDA o AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metilisoazol-4-propionato) en la membrana sináptica, permitiendo el inicio de la respuesta LTP, pero no su permanencia, de forma que la presencia de A β provoca la internalización de los receptores NMDA mediante endocitosis (Haass y Selkoe, 2007). Los oligómeros pueden inducir cambios en la membrana neuronal y glial, lo que conlleva 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.

1.2.8. Hipótesis de la cascada amiloide

El descubrimiento del A β permitió formular la hipótesis de la cascada amiloide, ya que es el principal componente de las placas seniles. Esta teoría propone que el depósito de A β es el evento inicial de la EA, provocando la formación de los ovillos neurofibrilares, la muerte celular y, finalmente, demencia (Fig. 1.5). Sin embargo, existen observaciones que revocan esta teoría, como son aquellos animales transgénicos que sobre-expresan mutaciones en APP, y que no desarrollan la secuencia de eventos de la cascada amiloide. Además, la aparición tanto de las placas seniles como de los ovillos se produce en momentos y lugares diferentes. Los ovillos aparecen antes en la corteza entorrinal y el hipocampo que el resto de lesiones asociadas, mientras que en otras zonas aparecen antes las placas, lo que podría indicar que se desarrollan de forma independiente (Armstrong, 2006).

La hipótesis de la cascada del A β ha sido modificada en la última década, de modo que determinados cambios en el metabolismo del A β provocarían el inicio de la cascada amiloide, generando una elevación de los niveles de A β , ya fuera por sobreproducción o por falta de eliminación, incrementando la proporción A β_{42} /A β_{40} . Debido a que la forma A β_{42} tiende a oligomerizar más fácilmente que la A β_{40} , se potencia la formación de oligómeros de A β_{42} , que son difusibles, lo que provoca cambios en la función sináptica, primero muy sutiles y, posteriormente, más severos. Esto provoca la activación de la respuesta inflamatoria (astroglía y microglía) en el momento de la formación de las placas extracelulares, cuando se forman las primeras fibrillas de amiloide, lo que provoca la pérdida de las espinas sinápticas y genera neuritas distróficas. Con el tiempo se genera estrés oxidativo y se ve afectada la homeostasis neuronal. Posteriormente, estos cambios neuronales provocarían daños en el transporte axonal y que la actividad fosfatasa de las quinasas estuviera alterada, provocando la hiperfosforilación de la proteína tau y, consecuentemente, la formación de ovillos neurofibrilares. Finalmente, la cascada terminaría con la muerte neuronal masiva y un estado de demencia progresivo (Haass y Selkoe, 2007).

Hipótesis de la cascada amiloide

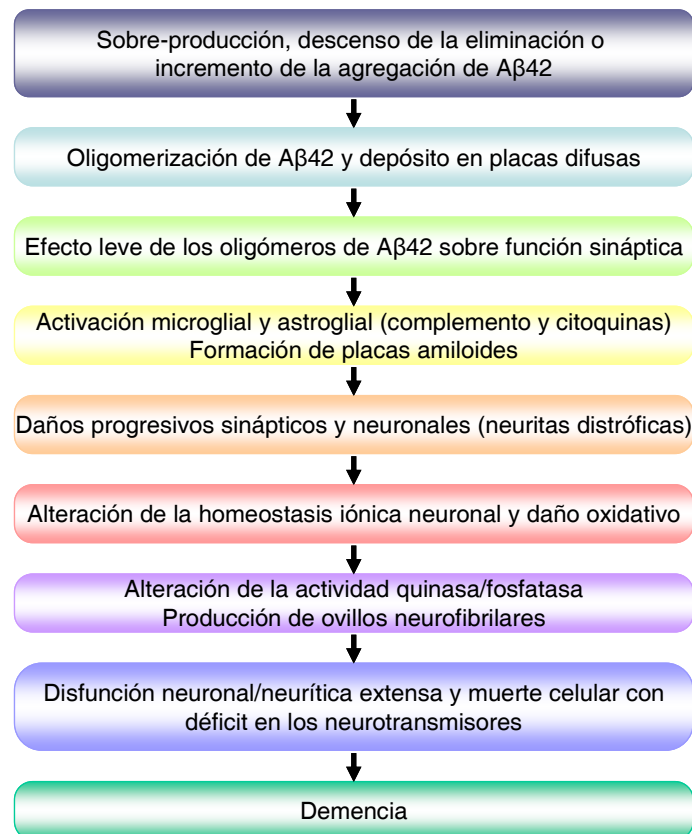


Figura 1.5. Hipótesis de la cascada amiloide. Los cambios graduales en los niveles de Aβ cerebral inician la cascada amiloide. Los niveles de Aβ se elevan por varias causas, así como la relación Aβ42/Aβ40 por mutaciones en 3 genes (APP, PS1 o PS2) que causan la EA familiar. Esto conlleva fallos sinápticos, muerte neuronal, aparición de una respuesta inflamatoria y neuritis distróficas. Se genera estrés oxidativo, cambios iónicos (en la homeostasis del calcio) y fallos del transporte axonal. Finalmente, tras la formación de placas amiloides fibrilares, existe una amplia disfunción neuronal y sináptica, que conlleva a la aparición de demencia asociada a la extensa patología de Aβ y tau. Modificado de Haass y Selkoe, 2007.

1.3. Ovillos neurofibrilares y proteína tau hiperfosforilada

La proteína tau es un fosfolipopéptido que se encuentra normalmente asociada a los microtúbulos del citoesqueleto, principalmente en los axones, cuya función es estabilizar los microtúbulos y favorecer su polimerización, por lo que es crítica para la supervivencia celular, ayudando a mantener la estructura interna de la célula. Cuando se produce una hiperfosforilación anómala de esta proteína, los microtúbulos del citoesqueleto se desorganizan y la proteína tau al ser insoluble tiende a agregarse formando filamentos apareados helicoidales (PHF) formando finalmente los ovillos neurofibrilares (NFT o *tangles*) intracelulares característicos de la enfermedad de Alzheimer (Fig. 1.6). La hiperfosforilación de tau se da en las neuronas con degeneración neurofibrilar y en las neuritis distróficas alrededor de los depósitos de amiloide, dando lugar a placas neuríticas. Tau tiene 79 residuos de serina y treonina que pueden aceptar una fosforilación, 30 de los cuales no generan una fosforilación anormal. Las enzimas implicadas en la adición de grupos fosfato a

la proteína tau son principalmente la proteína quinasa dependiente de ciclina 5 (cdk5) y la quinasa glucógeno sintasa 3 (GSK-3) y las proteínas fosfatasa PP-1 y PP-2A y otras serín-treonin proteínas-quinasa (ver revisiones Lee y col., 2001; Iqbal y Grundke-Iqbal, 2008).

La proteína tau humana está codificada por el cromosoma 17q21, que consta de 16 exones. Las distintas isoformas existentes en el SNC se generan por procesamiento alternativo de 11 de los exones. El procesamiento alternativo de los exones 2, 3 y 10 genera 6 isoformas diferentes. La interacción de tau con los microtúbulos está mediada por 3 de los 4 dominios de repetición que se encuentran en la región C-terminal, codificada por los exones 9 a 12. El procesamiento alternativo de los exones 2, 3 y 10 genera 3 ó 4 dominios de repetición, conocidos como 3R y 4R, respectivamente. En el adulto, la razón 3R/4R es aproximadamente 1 (Brandt y col., 2005).

Debido a la presencia de NFTs intracelulares formados por la proteína tau hiperfosforilada, la EA es una taupatía, término que agrupa distintas enfermedades con depósito anormal de tau altamente fosforilada en neuronas y en células gliales. Además de la EA, existen otras taupatías como son la enfermedad de Pick, la parálisis supranuclear progresiva, la degeneración córtico-basal, la enfermedad de los granos argirófilos y otras taupatías ligadas a mutaciones en el gen de tau como la demencia fronto-temporal (Lee y col., 2001).

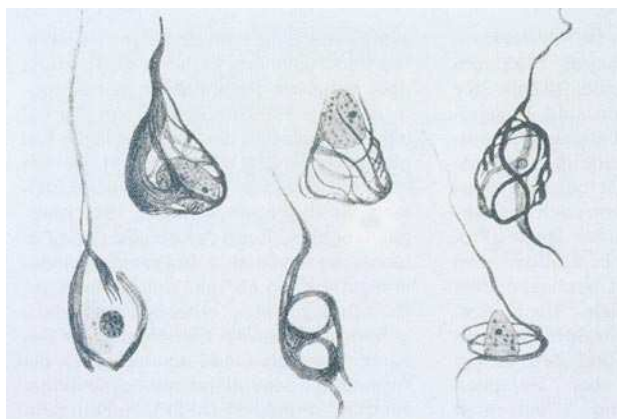


Figura 1.6. Dibujo original de Alois Alzheimer de los ovillos neurofibrilares. Alois Alzheimer realizó una serie de dibujos de las preparaciones histológicas procesadas con tinción de plata, en las que observó acumulaciones intraneuronales en forma de hilos o marañas, que hoy en día se conocen como ovillos neurofibrilares formados por la proteína tau hiperfosforilada.

Se sabe que la existencia de grandes cantidades de A β , así como la existencia de estrés oxidativo en las células o cambios en la transducción de señales pueden provocar una desregulación en la actividad de las serín-treonin quinasa que fosforilan a tau, provocando su hiperfosforilación y la generación de los ovillos neurofibrilares, aunque no todo el tau hiperfosforilado forma PHF, ya que más de un 40% permanece en el citosol sin agregarse. La formación de ovillos provocan una degeneración del transporte axonal, lo que conlleva a una pérdida sináptica, generación de neuritas distróficas y muerte neuronal (Iqbal y Grundke-Iqbal, 2008). Existen múltiples mutaciones conocidas que afectan al gen de la proteína tau, muchas de ellas de falta de sentido, y otras que afectan directamente a la zona

Introducción

del dominio de unión a los microtúbulos o generan nuevos sitios de fosforilación y todas ellas pueden generar la formación de NFTs (ver revisión Brandt y col., 2005).

A diferencia de lo que ocurre con las placas amiloides, el número de NFTs se correlaciona de forma muy estrecha con el grado de demencia. El sitio en el que se forman los NFTs durante el desarrollo de la enfermedad no es aleatorio, sino que sigue un patrón estereotipado, determinado por 6 estadios neuropatológicos, denominados las fases de Braak (Braak y Braak, 1991) (Fig. 1.7). Durante la fase I y II, denominadas fases transentorrinales, los NFTs aparecen en la corteza entorrinal y transentorrinal, durante la cual los pacientes de EA no presentan fallos cognitivos apreciables. Durante las fases III y IV, o fases límbicas, los ovillos aparecen en mayor cantidad en la corteza entorrinal y comienzan a aparecer en la región CA1 del hipocampo, momento en el que pueden empezar a aparecer fallos cognitivos de forma moderada. Finalmente, en las fases isocorticales, los ovillos aparecen en las áreas de asociación neocorticales. Es en estos estadios cuando los individuos presentan una sintomatología grave y se les suele diagnosticar la enfermedad.

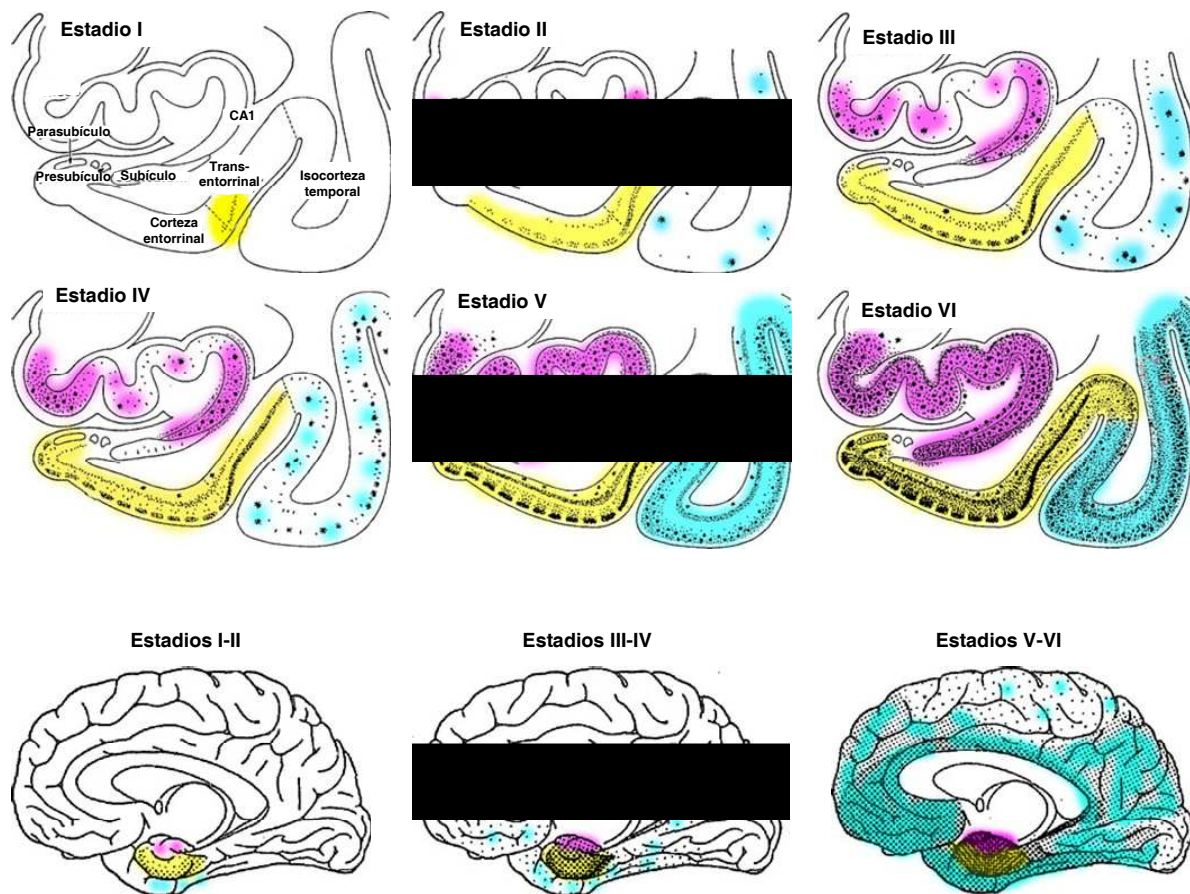


Figura 1.7. Esquemas de las fases o estadios de Braak de la aparición espacio-temporal de los ovillos neurofibrilares en el cerebro humano. Los ovillos neurofibrilares comienzan a aparecer en el estadio I-II en la región transentorrinal (amarillo) y se extiende por la formación hipocampal (rosa) y la isocorteza (azul), principalmente del lóbulo temporal. Existe muerte neuronal pero no fallos cognitivos. Durante los estadios III-IV, los ovillos se extienden por las zonas mencionadas y aparecen en la neocorteza, acompañada por síntomas de demencia. En los estadios V y VI existe una muerte neuronal extensiva y grandes fallos cognitivos y de memoria. La demencia es severa. Modificado de Braak y Braak, 1991.

El aumento de la expresión y fosforilación de tau con la edad no afecta al inicio ni al progreso de la patología amiloidea, ya que el procesamiento y posterior acumulación de A β se produce de forma más temprana en el desarrollo de la enfermedad que la formación de NFTs. Además, la existencia de mutaciones en tau provoca neurodegeneración en ausencia de acumulación de A β , sugiriendo que la generación de NFTs no provoca un aumento en los niveles de A β , corroborando la hipótesis de la cascada amiloide, siendo el A β el que favorece la formación de ovillos neurofibrilares (Oddo y col., 2007).

1.4. Pérdida neuronal y sináptica

1.4.1. Pérdida neuronal

1.4.1.1. Pérdida neuronal en la enfermedad de Alzheimer

La muerte o degeneración neuronal es un fenómeno común durante el envejecimiento que se produce de manera prematura en situaciones de daño cerebral agudo (isquemia o traumatismos encefálicos) y crónicos, como son las enfermedades neurodegenerativas (la EA, el Parkinson, la corea de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica), que se caracterizan por la pérdida neuronal selectiva de determinadas subpoblaciones en el SNC. La EA es un desorden neurodegenerativo progresivo caracterizado por una extensa degeneración neuronal.

Existen múltiples estudios que indican la existencia de pérdida neuronal durante el envejecimiento normal tanto en el hipocampo como en áreas neocorticales. Además, debido a que la enfermedad de Alzheimer es, en cierto modo, muy similar a un envejecimiento prematuro (patológico), se ha demostrado que existe una importante disminución del número de neuronas en casos de EA, que afecta principalmente a las neuronas del área CA1 del hipocampo (Price y col., 2001; Hof y col., 2003) y la capa II de la corteza entorrinal (Morys y col., 1994; Gomez-Isla y col., 1996; Kordower y col., 2001; Hof y col., 2003), existiendo una vulnerabilidad selectiva en las áreas de asociación neocorticales, las capas corticales y, específicamente, en las poblaciones celulares (Giannakopoulos y col., 1998; Thompson y col., 2003).

En los casos preclínicos de EA, en los que no existe demencia, aunque ya aparecen las primeras placas amiloides y ovillos neurofibrilares, la región CA1 del hipocampo y la corteza entorrinal no muestran una disminución significativa del número de neuronas (Giannakopoulos y col., 1998). Sin embargo, en la fase intermedia o moderada de la enfermedad, existe un 35% de pérdida neuronal en la corteza entorrinal, siendo un 50% en la capa II (Price y col., 2001). En la fase avanzada, se ha cuantificado una reducción del 32% en la corteza entorrinal, un 57% en la capa II y un 41% en capa IV, mientras que las demás capas sufren una pérdida neuronal del 25% (Gomez-Isla y col., 1996), así como un 21% de reducción en el volumen de la corteza entorrinal. Además, el declive cognitivo se correlaciona estrechamente con la pérdida neuronal. Gracias a las técnicas de resonancia magnética, se ha podido realizar un seguimiento del avance de la enfermedad a lo largo del

tiempo. En las imágenes obtenidas de pacientes con EA se ha observado que existe un patrón de afección de la enfermedad en distintas regiones cerebrales, viéndose afectada en primer lugar la corteza temporal, seguida de la frontal y, finalmente, disminuye la densidad neuronal en la corteza somatosensorial, de tal modo que en estadios tempranos de la enfermedad existe una disminución del 15% de la materia gris de la corteza temporal y parietal de manera bilateral, mientras que regiones como la corteza motora o la sensorial primaria apenas se ven afectadas (<5%). Un año más tarde, las imágenes realizadas en el mismo individuo registraron que la corteza frontal pasaba de tener una pérdida neuronal del 6% a más del 15%, mientras las áreas motoras y sensoriales permanecían sin daños (Thompson y col., 2003). Por lo tanto, el lóbulo temporal es especialmente susceptible a la EA. La vulnerabilidad de las áreas de asociación neocortical posiblemente se deba a la conexión funcional que tienen con las estructuras límbicas, zona de inicio de la patología. La pérdida celular tardía en las áreas de asociación puede ser el resultado de la remodelación cortical producida por los fallos que se generan en las neuronas de la región límbica y paralímbica que las inervan. Además, la corteza entorrinal se ve afectada más severamente que el hipocampo y la atrofia que sufren tanto la corteza entorrinal como el hipocampo se correlaciona perfectamente con la pérdida de memoria propia de la EA en la fase moderada (Du y col., 2004).

Los modelos animales transgénicos para la enfermedad de Alzheimer, recapitulan algunas de las características histopatológicas observadas en los pacientes, pero no todas. Es de destacar, que la mayoría de estos modelos presentan escasa muerte neuronal. En relación a esto, se ha descrito pérdida neuronal selectiva en el hipocampo (Casas y col., 2004; Schmitz y col., 2004), la neocorteza (Bondolfi y col., 2002; Christensen y col., 2008), la corteza entorrinal (Lazarov y col., 2006) y otras regiones cerebrales (Takeuchi y col., 2000; Ribe y col., 2005; Lee y col., 2006). Como ejemplos, en el modelo murino PS1xAPP, objeto de este trabajo, se ha encontrado una reducción selectiva de más del 50% en interneuronas GABAérgicas que contienen SOM/NPY en el estrato oriens y en el hilo del giro dentado de la formación hipocámpal a los 6 meses de edad y de las neuronas principales de CA1 a los 18 meses (Ramos y col., 2006). En los animales transgénicos PS1_{KI} existe una pérdida masiva de más del 50% en las neuronas principales de la región CA1/2 del hipocampo a la edad de 10 meses (Casas y col., 2004). La pérdida de estos tipos neuronales en los animales transgénicos coincide con la neurodegeneración que se produce en los pacientes de Alzheimer.

1.4.1.2. Mecanismos de muerte neuronal

Las causas y los mecanismos de muerte neuronal se desconocen, aunque poseen un papel importante la generación de especies reactivas de oxígeno, la sobre-activación de receptores de aminoácidos excitadores como el glutamato y el incremento en la concentración citoplasmática de Ca^{2+} .

La desregulación de la homeostasis del calcio depende de la activación de los canales de calcio, los niveles internos y la producción de radicales libres por enzimas

sensibles al calcio. La neurodegeneración está relacionada con la edad del individuo, debido a que durante el envejecimiento existe un incremento de estrés oxidativo, metabólico e iónico, lo que provoca una acumulación de proteínas, membranas y ADN dañados. La vulnerabilidad neuronal depende del tamaño y la localización celular, el metabolismo de determinadas proteínas implicadas en las enfermedades y el repertorio de vías de transducción de señales y los mecanismos de resistencia al estrés. Además, el sistema glutamatérgico también está implicado en el proceso citotóxico (Hölscher, 1998; Mattson y Magnus, 2006). El proceso neurodegenerativo, además, está asociado a las características morfológicas y bioquímicas a nivel celular, ya que la apoptosis puede estar iniciada por el estrés oxidativo, daño en el ADN, desequilibrio en la homeostasis del calcio o estrés del retículo endoplásmico (Culmsee y Landshamer, 2006).

La apoptosis o muerte celular programada puede ser activada mediante dos vías. La vía extrínseca o de receptores de muerte se inicia a partir de la llegada de un estímulo de muerte o pro-apoptótico, como son el ligando Fas (FasL) y el factor de necrosis tumoral (TNF). Cuando estas moléculas se unen a sus receptores de membrana (Fas y TNFR, respectivamente), se inicia una cascada intracelular de eventos en la que se activan las caspasas iniciadoras de la apoptosis, como la caspasa-8 y 10 que, a su vez, activan a la caspasa-3, de naturaleza efectora, llevando a fin el proceso apoptótico.

Por otro lado, la vía intrínseca o mitocondrial está regulada por la familia de proteínas Bcl-2 (del inglés *B-cell lymphoma 2*), unas son anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL) y otras pro-apoptóticas multidominio (Bax y Bak) y de tipo “BH3-only” (Bim, Bid, Bad). Las proteínas BH3-only activan a las pro-apoptóticas multidominio, capaces de generar un poro en la membrana mitocondrial, mientras que las anti-apoptóticas inhiben la formación del poro. La formación del poro mitocondrial permite que el citocromo c retenido en el interior de la mitocondria se libere hacia el citoplasma, donde formará complejo con la procaspasa-9, que se activará y con APAF1 (*apoptosis protease-activating factor-1*), formando el apoptosoma, que corta a la procaspasa-3, generando caspasa-3 activada, que es la caspasa efectora. Además, con la apertura del poro se libera la proteína Smac/Diablo, que inhibe a la IAP o inhibidor de proteínas de la apoptosis, cuya función es inhibir la activación de la caspasa-3, lo cual favorece la apoptosis. Por lo tanto, ambas vías pueden activarse a la vez.

1.4.2. Pérdida sináptica

La enfermedad de Alzheimer también se caracteriza por una pérdida muy acusada de las conexiones sinápticas, lo que genera el fallo en las funciones cognitivas y de procesamiento de memoria. Es posible que la pérdida neuronal no sea la causa directa del déficit de memoria generado durante el envejecimiento y la EA, sino cambios en los circuitos de procesamiento de la memoria en el sistema límbico y áreas asociativas.

La plasticidad sináptica es la capacidad de realizar una sinapsis entre dos neuronas para cambiar la intensidad de una señal, proporcionando la base para los distintos tipos de memoria y aprendizaje. Dos tipos de plasticidad sináptica son la potenciación (LTP) y la depresión (LTD) a largo plazo. Actualmente, se reconoce que los defectos que se producen

en la plasticidad sináptica son la base del declive cognitivo que se produce en la EA. La pérdida sináptica o su disfunción se correlaciona con el grado de demencia, ya que la acumulación de A β está asociada con la pérdida de función sináptica y con la formación de neuritas distróficas y estos cambios sinápticos parecen tener un gran efecto sobre los procesos de memoria y aprendizaje. Además la toxicidad del A β disminuye la excitabilidad neuronal, provocando la internalización de receptores AMPA, lo que genera depresión sináptica y pérdida de espinas dendríticas, provocando la interrupción de la LTP, imprescindible en la plasticidad sináptica asociada con los procesos de memoria y aprendizaje (Small, 2008).

Se ha propuesto que la forma A β_{42} promueva la endocitosis de receptores NMDA, reduciendo su densidad en las sinapsis. A β_{42} puede ser secretado en la hendidura sináptica y unirse a los receptores $\alpha 7$ -nicotínicos, provocando la activación de calcineurina, lo que inicia una cascada de señales que conlleva a la internalización de los receptores NMDA, disminución de su densidad en las sinapsis y de la transmisión glutamatérgica y fallo en la plasticidad sináptica (Tanzi, 2005).

Se ha demostrado que la presencia de A β oligomérico provoca una reducción de la densidad de espinas dendríticas y una pérdida de sinapsis electrofisiológicamente activas en cultivo de neuronas principales del hipocampo, mientras que la adición de monómeros no tiene el mismo efecto (Shankar y col., 2007). Sin embargo, existen otros estudios que muestran una pérdida sináptica en ausencia de la deposición de A β , o anterior al depósito, posiblemente debido a que las formas neurotóxicas son las oligoméricas y no las depositadas en placas.

Además de la pérdida de plasticidad sináptica, en pacientes de Alzheimer se produce pérdida de espinas dendríticas (Moolman y col., 2004), así como en animales transgénicos APP y PS1xAPP (Moolman y col., 2004; Jacobsen y col., 2006), en los que existe una disminución de espinas dendríticas del 50% y 36% respectivamente. Incluso, se ha detectado una axonopatía severa en el modelo animal PS1xAPP_{KL}, tanto en el SNC como en el SNP desde los 6 meses de edad, excepto en el cerebelo, donde no se expresa el promotor de la mutación Thy1 (Wirhys y col., 2007).

1.5. Neuroinflamación

La reacción inflamatoria que caracteriza a la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, incluida la EA, se denomina neuroinflamación y consiste, principalmente, en componentes de la respuesta inmune innata. La microglía (macrófagos del cerebro) y los astrocitos son las principales células que participan en esta respuesta inflamatoria. La respuesta inmune adaptativa y la infiltración de linfocitos T se da en menor grado en la EA. Mientras que la respuesta inflamatoria es necesaria y crucial si el agente desencadenante es un patógeno o una célula dañada, la respuesta inflamatoria aberrante o crónica causa graves daños titulares. 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 (Wyss-Coray, 2006). Aún se desconoce si la

neuroinflamación es una consecuencia secundaria al proceso de neurodegeneración en la EA o es una de las causas que podrían provocar su aparición y desarrollo.

1.5.1. Microglía

El SNC es un órgano inmunológicamente privilegiado, ya que tiene un sistema inmune endógeno liderado por células inmunocompetentes propias denominadas células microgliales. Las células de la microglía, descritas por primera vez por Pío del Río Hortega en 1919, son células de soporte y protección de neuronas del SNC constituyendo, aproximadamente, un 10% de las células del SN. Se encuentran habitualmente dispersas en el tejido nervioso de forma quiescente y actúan como células de defensa. Clásicamente, la microglía se diferencia en microglía en reposo, también denominada residente o quiescente, y en microglía reactiva o activada, con características funcionales similares a los macrófagos sanguíneos. Expresan el complejo mayor de histocompatibilidad II (MHCII), citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas, especies reactivas de oxígeno (ROS) y proteínas del complemento. Poseen capacidad fagocítica y pueden tener propiedades neurotóxicas o neuroprotectoras según la señal de activación que reciban (Tuppo y Arias, 2005).

La microglía, al igual que los macrófagos periféricos, pueden activarse, no se sabe si de forma permanente o reversible, dando lugar a diversos fenotipos funcionales (Fig. 1.8) (ver revisión Duque y Rojas, 2007):

- Activación clásica. Los macrófagos activados clásicamente ó **M1** son inducidos por IFN γ , TNF α y/o ligando de receptores TLR (toll like receptor), como pueden ser los lipopolisacaridos o LPS (endotoxinas de la membrana externa de bacterias Gram negativas). Estos macrófagos muestran un fenotipo Th1 (pro-inflamatorio) y son efectores pro-inflamatorios. Producen IFN γ e IL2, además de IL1 β , IL6, IL12, IL18, TNF α , ROS y óxido nítrico (NO), entre otros. Poseen una mayor expresión de MHCII y CD86 e intervienen en la presentación antigénica asociada a las células Th1. La expresión de IL1, IL6 y TNF α es inducida por IFN γ e inhibida por IL4.
- Activación alternativa. Los macrófagos activados alternativamente ó **M2** exhiben un fenotipo Th2 (anti-inflamatorio). Están involucrados en la resolución de la inflamación y reparación del tejido, ya que poseen propiedades anti-inflamatorias, inhibiendo la producción de IFN γ . Producen IL4, IL5 e IL10. Existen 3 tipos de macrófagos M2 (Tabla 1.3):

Introducción

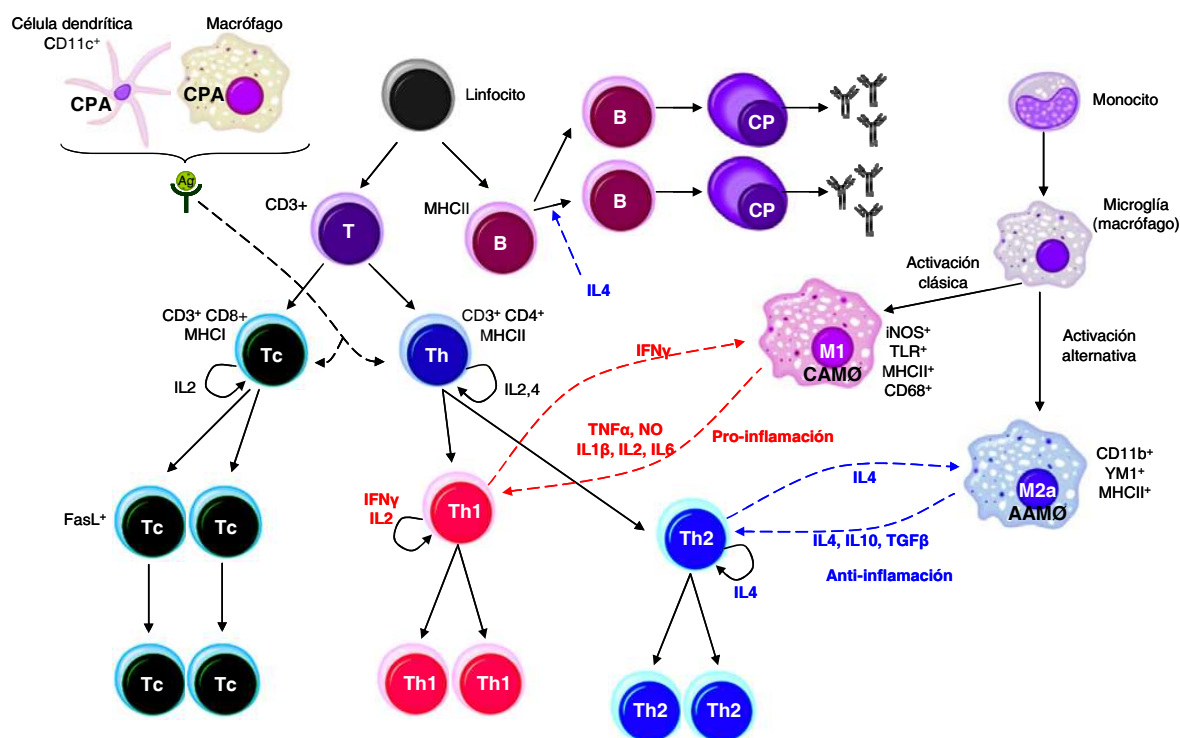


Figura 1.8. Esquema de la relación entre los distintos componentes celulares de la respuesta inflamatoria. En la respuesta inflamatoria, en general, participan los linfocitos B, que intervienen en la producción de anticuerpos mediante células plasmáticas (CP), y los linfocitos T, tanto citotóxicos (Tc) como *helper* (Th), tras el reconocimiento de antígenos (Ag) a través de las células presentadoras de antígeno (CPA) macrófagos y células dendríticas. Estos linfocitos Th pueden diferenciarse en Th1 (pro-inflamatorios) y Th2 (anti-inflamatorios), provocando la activación de la microglía clásica (M1) y la alternativa (M2), respectivamente, desde las formas quiescentes mediante la producción de interleuquinas (IL) y citoquinas como IFNγ (interferón gamma) y TNFα.

- **M2a:** La activación es inducida por IL4 e IL13 a través de los receptores TLR, generando un aumento en la expresión en superficie de los receptores del complemento, como son CD11b, CD11c y de MHCII. Además, IL13 favorece la expresión de lectinas en superficie para la presentación antigénica de lípidos y glicolípidos. Producen NO y una citoquina de tipo quitinasa y quitotriosidasa, denominada AMCasa en humanos o Ym1/2 en los animales murinos.
- **M2b:** Se activa por la exposición a complejos inmunes y agonistas de los TLR. Expresan grandes cantidades de IL10 y NO y poca IL12, además de citoquinas pro-inflamatorias IL1β, IL6 y TNFα, así como altos niveles de MHCII. Promueven la diferenciación Th2, siendo muy similares a los M1 en animales murinos, aunque el patrón de producción de citoquinas difiere.
- **M2c:** Microglía activada por IL10 y glucocorticoides e incluso TGFβ (factor de crecimiento transformante beta). Los dos primeros inhiben la producción de citoquinas pro-inflamatorias, mientras que el TGFβ posee un papel dual, según el estado de diferenciación del monocito. Es un agente pro-inflamatorio en monocitos no activados, mientras que su acción es anti-inflamatoria sobre los macrófagos activados. Presentan baja expresión de MHCII y CD86.

Nombre	M1	M2a	M2b	M2c
Activación	LPS, IFN γ , TNF α	IL4, IL13	Complejos inmunes, ligandos TLR	IL10, TGF β , glucocorticoides
Producción	IFN γ e IL2, IL1 β , IL6, IL12, IL18, TNF α , ROS y NO	IL4, IL5 e IL10	IL1 β , IL6, IL10, IL12, NO y TNF α	IL10, TGF β
Marcadores	CD16, CD32, CD64, TLR2, TLR4	CD23, CD206, CD163, Ym1/2		

Tabla 1.3. Resumen de los tipos de microglía activada. En la tabla se muestra el nombre que reciben, las moléculas que producen su diferenciación, la producción mayoritaria de interleuquinas y citoquinas que producen y los marcadores por los que se las puede diferenciar a cada una de forma independiente. Modificado de Vega y Corbi, 2006.

La EA se caracteriza por la existencia de un proceso inflamatorio cuya cronificación puede incrementar el proceso neurodegenerativo propio de la enfermedad debido a la activación de la microglía y la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Griffin y col., 1998; Akiyama y col., 2000; McGeer y McGeer, 2001; Mrak y Griffin, 2005; Tuppo y Arias, 2005; Wojtera y col., 2005; Wyss-Coray, 2006; Griffin, 2006; Heneka y O'Banion, 2007; Mrak y col., 2007; Venneti y col., 2008), al igual que ocurre en otras enfermedades neurodegenerativas, como el Parkinson (ver revisión Mena y Yebenes, 2008). De hecho, existe correlación entre la producción de TNF α y la activación microglial en la corteza entorrinal de modelos animales de la EA (Janelins y col., 2005). Este proceso inflamatorio se produce tras el depósito extracelular del péptido A β y se caracteriza por una activación de la microglía y la aparición de astrocitos reactivos, que pueden generar productos tóxicos que provoquen la muerte neuronal, tales como citoquinas inflamatorias, aminoácidos excitadores y ROS (Combs y col., 2001; Mrak y Griffin, 2005). En la EA, es la formación del péptido A β el que desencadena la activación de las células microgliales (Akiyama y col., 2000), de igual manera a como reaccionarían las células microgliales en presencia de microorganismos, a través del receptor CD14 (Butovsky y col., 2005). De hecho, el APP soluble y distintas formas de A β pueden activar la respuesta inmune innata. Debido a que es el A β el que inicia el proceso inflamatorio, son las zonas en las que más A β se deposita las que muestran mayor activación microglial, como el hipocampo, el subículo y la corteza entorrinal. Esta activación de la microglía se da durante la transición de una placa difusa a una placa primitiva (Sasaki y col., 1997). El A β puede atraer y activar la microglía, generando una acumulación microglial alrededor de los depósitos de A β (Malm y col., 2005; Meyer-Luehmann y col., 2008), que actúa, posiblemente, de forma fagocítica para eliminar las placas amiloideas, internalizándolas (Frautschy y col., 1992; Weldon y col., 1998), intentando que la placa no aumente de tamaño (Simard y col., 2006; Bolmont y col., 2008). La microglía puede expresar receptores de adhesión a A β fibrilar, lo que genera la liberación de ROS, aumento de receptores MHCII en superficie y secreción de citoquinas proinflamatorias como IL1 β , IL6, TNF α y quimioquinas entre otras moléculas (Rogers y Lue, 2001; Colton y col., 2006a; Griffin, 2006). Incluso, el A β provoca que los macrófagos periféricos circulantes crucen la barrera hematoencefálica (BHE), induciendo un incremento

del proceso inflamatorio (Fiala y col., 1998). Además de la fagocitosis, el A β puede inducir la expresión de la sintasa del óxido nítrico (NOS) en la microglía, generando daño neuronal debido a los productos secretados por la microglía más que por la presencia de A β (Weldon y col., 1998; Combs y col., 2001). La microglía cargada de A β migra hacia los vasos sanguíneos y los ventrículos para intentar liberar al cerebro del amiloide, generando un depósito de A β endotelial, ya que las fibras de amiloide pueden tardar varios días en ser degradadas por la microglía. Bajo estímulos pro-inflamatorios, la microglía puede generar A β , aunque en poca cantidad comparado con la producción neuronal (Bitting y col., 1996). Por otro lado, la microglía es capaz de degradar A β al liberar la enzima degradante de insulina (Chesneau y col., 2000).

Aunque la microglía activada pueda generar mediadores pro-inflamatorios, también es capaz de secretar citoquinas anti-inflamatorias (Butovsky y col., 2006) y factores neuroprotectores (Streit, 2005). El posible papel neuroprotector de la inflamación en la EA está cobrando fuerza actualmente y, en apoyo de esta idea, está el reciente estudio en el que la ausencia de microglía en un modelo animal de la EA provoca un incremento en la formación de placas amiloides y aumenta la muerte neuronal (El Khoury y col., 2007).

En humanos y en animales transgénicos de la EA se ha observado la existencia de distintos tipos de activación microglial, pudiendo ocurrir un cambio durante la progresión de la enfermedad (Vega y Corbi, 2006; Colton y col., 2006a; Hanisch y Kettenmann, 2007; Jimenez y col., 2008). En ese sentido, nuestro grupo de investigación ha descrito recientemente (Jiménez et al., 2008) la existencia de un cambio, dependiente de la edad, del fenotipo microglial en el hipocampo del modelo PS1xAPP. A edades tempranas (4-6 meses), los depósitos amiloides inducen una activación microglial alternativa, de tipo Th2 anti-inflamatoria, con expresión del marcador alternativo Ym1. Estas células activadas se localizan alrededor de las placas y su función es, posiblemente, neuroprotectora (expresión del factor de crecimiento insulínico 1 o IGF1 y fagocitosis). Sin embargo, a edades avanzadas la microglía interplaca también aparece activada, pero en este caso de forma clásica de tipo Th1 pro-inflamatoria con expresión de los factores citotóxicos TNF α , FasL y TRAIL. La activación clásica es coincidente en el tiempo con la neurodegeneración de neuronas piramidales en este modelo animal. Sin embargo, actualmente no existe demasiada información sobre el balance entre los procesos pro- y anti-citotóxicos que se producen en la EA o acerca de la inducción celular y temporal de la cascada inflamatoria producida por el A β .

La activación glial puede ser analizada in vivo mediante PET, a través del empleo del ligando específico de microglía denominado 1-(2-clorofenil)-N-metil-N-(1-metil-propil)-3-isoquinolina carboxamida o PK11195, que se une específicamente a los receptores de benzodiazepinas periféricos (PBRs). Estos PBRs son particularmente abundantes en células microgliales (Park y col., 1996), por lo que al unirse a un ligando radioactivo se puede marcar específicamente las células microgliales activadas (Venneti y col., 2008a). A través de tomografías de emisión de positrones y microautografías, se ha visto que en las células microgliales activadas, pero no en las residentes, existe un aumento de los sitios de unión,

aumentando la densidad de los PBRs para el ligando [^3H]-PK11195 en pacientes con esclerosis y enfermedad de Alzheimer (Cagnin y col., 2001; Venneti y col., 2008b).

1.5.2. Astrogliá

Los astrocitos son células gliales del SNC que se caracterizan por la expresión de la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) y vimentina. En general, contribuyen, junto con el tejido conectivo, al mantenimiento y sostén de las células neuronales, manteniendo la integridad funcional de las sinapsis. Además, los astrocitos facilitan el proceso de cicatrización glial alrededor de una zona de lesión, aislándola del resto del tejido, ayudando a su reparación junto a la microglía. Sus pies perivasculares envuelven los capilares sanguíneos y forman una membrana entre el tejido nervioso y las meninges.

En el proceso inflamatorio que se produce en la EA, los astrocitos se concentran en las regiones de depósito de las placas de A β , secretando moléculas pro-inflamatorias, como interleuquinas, prostaglandinas, leucotrienos y factores de coagulación, actuando de forma similar a como lo hace la microglía. Además, se conoce que los astrocitos también poseen capacidad neuroprotectora, ya que son capaces de eliminar glutamato del espacio extracelular, previniendo daños por excitabilidad neuronal, además de proteger a las neuronas contra el daño oxidativo, ya que poseen una alta actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD-1) (Pertusa y col., 2007). Esta acumulación alrededor de las placas permite la fagocitosis de los péptidos amiloides (Tuppo y Arias, 2005). Existen varios estudios que indican la existencia de péptidos A β en el interior de células astrocitarias (Funato y col., 1998; Kurt y col., 1999; Nagele y col., 2003), sugiriendo su implicación en la síntesis o fagocitosis de A β , siendo más probable esta última, ya que se ha determinado su capacidad fagocítica de A β tanto *in vitro* como *in vivo* (Wyss-Coray y col., 2003). Esta capacidad fagocítica de la astrogliá permite el aclaramiento de las placas amiloides, manteniendo un balance entre la producción y la eliminación del A β . Sin embargo, la astrogliá puede ser activada por el A β y producir quimioquinas, citoquinas y especies reactivas de oxígeno, generando daños celulares (Johnstone y col., 1999; Tuppo y Arias, 2005). Además, los astrocitos son capaces de producir NOS en los pacientes de la enfermedad de Alzheimer (Simic y col., 2000).

En la corteza entorrinal de pacientes de Alzheimer se ha encontrado un alto grado de correlación entre la densidad de astrocitos y de ovillos neurofibrilares, aunque no en el hipocampo ni en el subículo. Sin embargo, en estas tres regiones existe correlación entre el número de placas amiloides y el número de astrocitos GFAP-positivos (Muramori y col., 1998). Además, mientras que la densidad del número de placas no se correlaciona con la severidad de la enfermedad, sí lo hace el número de astrocitos inmunorreactivos tanto en la corteza entorrinal como en el hipocampo (Muramori y col., 1998). Los astrocitos hipertróficos en la enfermedad de Alzheimer están asociados a las placas amiloides, formando en las capas profundas de la corteza entorrinal grupos alrededor de las placas y de las neuronas que contienen ovillos neurofibrilares, mientras que en controles de edad avanzada, los astrocitos aparecen únicamente en la superficie de la corteza entorrinal (Porchet y col.,

2003), sugiriendo una relación estrecha entre la astroglia y las neuronas que sufren un proceso neurodegenerativo.

1.5.3. Células dendríticas

Las células dendríticas (ver revisión Turnbull y MacPherson, 2001) son una familia heterogénea de células derivadas de la médula ósea cuya función es iniciar la inmunidad mediada por antígeno. Son capaces de interiorizar y procesar antígenos extraños y mostrarlos en su superficie a otras células del sistema inmune, funcionando como células presentadoras de antígeno (CPA), junto con los macrófagos y los linfocitos B. Todos los subtipos celulares expresan la integrina CD11c, aunque difieren en su distribución tisular, la producción de citoquinas y el fenotipo que presentan en superficie. Cuando son activadas por un antígeno desconocido, lo presentan a los linfocitos T y B para iniciar la respuesta inmune adaptativa.

Las células dendríticas derivan de células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea o de monocitos circulantes que generan células dendríticas inmaduras, con una gran actividad endocítica y poca capacidad para activar linfocitos T. Estas células están constantemente comprobando el medio que les rodea en busca de antígenos desconocidos mediante receptores TLR, que reconocen estructuras específicas presentes en los patógenos. De esta manera, pueden fagocitar estas estructuras extrañas y procesarlas en su interior. Tras su contacto con el antígeno se activan y pasan a ser células dendríticas maduras, presentando los antígenos en su superficie a través de los MHC. Además, expresan los receptores de superficie CD80, CD86 y CD40 y el MHC II de forma constitutiva. De este modo, actúan como CPA, pudiendo activar a linfocitos T y B. Recientemente, se ha demostrado que también la microglía residente es capaz de adquirir propiedades funcionales y fenotípicas de células dendríticas maduras, actuando como CPA bajo determinados estímulos (Lambert y col., 2008).

Se sabe que durante el envejecimiento normal y en la EA la barrera hematoencefálica sufre alteraciones funcionales, perdiendo su integridad (ver revisiones Deane y Zlokovic, 2007; Desai y col., 2007; Donahue y Johanson, 2008). Esta alteración provoca un incremento en su permeabilidad, permitiendo la infiltración de células del sistema inmune en el parénquima neuronal, además de una pérdida en el aclaramiento del A β . En individuos sanos, sólo algunos linfocitos T y mastocitos son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica. Las células dendríticas están restringidas a las meninges y los plexos coroideos y raramente aparecen en el parénquima cerebral. En condiciones patológicas, los linfocitos y células dendríticas procedentes de la médula ósea son reclutadas por el SNC y pueden infiltrarse a través de la barrera, interviniendo en el proceso inflamatorio y contribuyendo a la progresión de la enfermedad (Stichel y Luebbert, 2007). Además, la ablación selectiva de las células dendríticas que derivan de la médula ósea genera un incremento de las placas amiloides en modelos de la enfermedad de Alzheimer (Butovsky y col., 2007).

1.5.4. Linfocitos T

Los linfocitos T son células del sistema inmune caracterizadas por presentar en superficie los denominados receptores de células T (TCR) por lo que son **CD3⁺**. Las células T tienen un papel neuroprotector importante en las enfermedades neurodegenerativas, ya que son capaces de modular una respuesta inflamatoria beneficiosa tras un daño neuronal (Chiu y col., 2008). Se dividen en:

1.5.4.1. Linfocitos T helper o colaboradores (Th)

Se caracterizan por ser **CD4⁺** (ver revisión Zhu y Paul, 2008). No son capaces de producir efectos citotóxicos o fagocíticos por sí mismos. Intervienen en la respuesta inmune adaptativa, esenciales para la formación de anticuerpos por los linfocitos B, la activación de los linfocitos T citotóxicos y la actividad bactericida de los macrófagos. El receptor TCR que poseen reconoce específicamente al MHCII, por lo que pueden ser activados mediante este mecanismo por las CPA. Tras su activación, los linfocitos Th pueden proliferar en presencia del factor de crecimiento IL2. Esto es posible a la producción de IL2 por los linfocitos Th activados y por la expresión en su superficie del receptor para esta citoquina, denominado IL2R o CD25. Esta IL2 también incrementa la proliferación de los linfocitos T citotóxicos CD8⁺.

Según su actividad, los linfocitos Th se diferencian en linfocitos Th *efectores*, que secretan un gran repertorio de citoquinas e intervienen directamente en la respuesta inmune, y linfocitos Th de *memoria*, que retienen la afinidad por el antígeno inicial que los activó y actúan de forma más rápida como células efectoras frente a una segunda exposición al antígeno. Finalmente, los linfocitos Th se diferencian en (ver Fig. 1.9):

- Linfocitos Th1: Expresan citoquinas pro-inflamatorias, principalmente IL2, importante para la formación de linfocitos T de memoria, IFN γ , que interviene en la activación de los macrófagos y TNF α . Esto genera la activación de la microglía a través de la vía clásica. La IL12 producida por macrófagos y células dendríticas favorece la diferenciación de los Th1 e inhibe a los Th2.
- Linfocitos Th2: Expresan citoquinas anti-inflamatorias. Secretan IL4, IL5, IL6, IL9, IL10, IL13 e IL25. La IL4 posee una acción positiva sobre la diferenciación de los linfocitos Th2 y negativa sobre los Th1. La IL10 también activa la proliferación de Th2 e inhibe la de los linfocitos Th1. Además, es capaz de activar a la microglía a través de la vía alternativa.
- Linfocitos Th17: Producen IL17a, capaz de inducir citoquinas inflamatorias, IL6 y quimioquinas como IL8 (CXCL8). También secretan IL17f, IL21 (que favorece la proliferación de los linfocitos Th17) e IL22.
- Linfocitos iTreg (reguladores inducidos): Son muy importantes en la regulación de la respuesta inmune, ya que tienen una acción supresora crítica frente a enfermedades auto-inmunes, gracias a la producción de citoquinas como TGF β , IL10 e IL35.

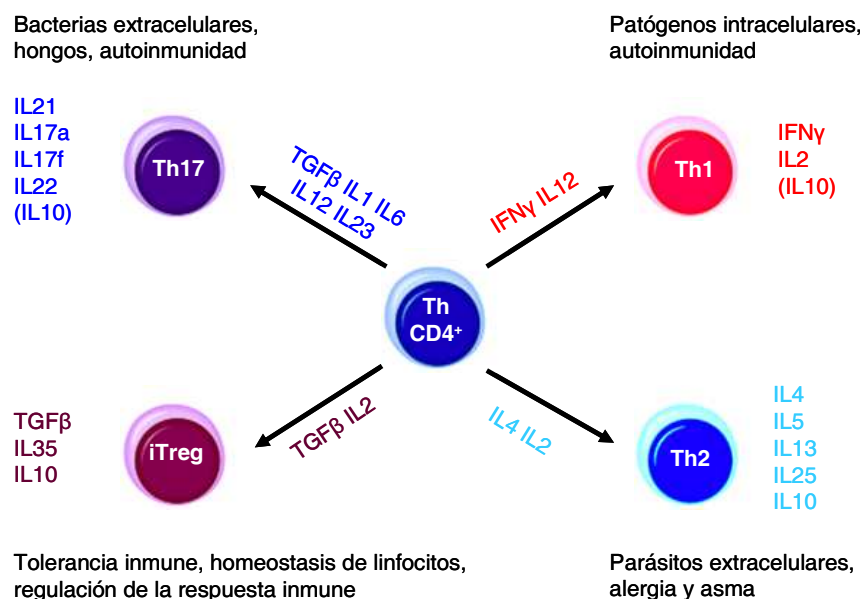


Figura 1.9. Esquema de los distintos tipos de linfocitos Th. En la figura se muestran los factores de diferenciación de cada serie: sus funciones, los productos que secretan y las citoquinas críticas para su diferenciación (Modificado de Zhu y Paul, 2008).

Aunque esta es la clasificación más general, últimamente aparecen estudios en los que se ha determinado la existencia de linfocitos T citotóxicos CD4⁺ (Van de Berg y col., 2008) y linfocitos reguladores Treg CD8⁺ (Niederborn, 2008).

1.5.4.2. Linfocitos T citotóxicos (Tc)

Son **CD8⁺** cuando están activados y presentan el receptor TCR capaz de unirse específicamente al MHC de clase I. Son linfocitos efectores de la inmunidad celular. Son capaces de neutralizar células infectadas por patógenos intracelulares o dañadas que presentan en su superficie los antígenos que han procesado intracelularmente a través del receptor MHC-I. Requieren de, al menos, 2 señales e incluso 3, por parte de las CPA para su activación. La expansión clonal de linfocitos Tc efectores requiere la presencia de IL2. Además, necesitan que los linfocitos Th CD4⁺ estimulen a las células dendríticas para que produzcan IL12 y/o IFN para que la expansión progrese adecuadamente (Mescher y col., 2007). Tras la activación, se desencadena una serie de eventos, como son la producción de perforina por parte del linfocito, que genera poros en la membrana de la célula diana por el que entrarán proteasas como la granzima, que activa la vía apoptótica mediante caspasas. Además, los linfocitos Tc son capaces de expresar FasL que se unirá a su receptor de muerte Fas presente en la superficie de la célula diana.

1.5.5. Citoquinas

Las citoquinas son proteínas de comunicación intercelular capaces de regular funciones celulares como la proliferación, diferenciación, crecimiento, producción de otras

moléculas y, sobre todo, la regulación del proceso inflamatorio uniéndose a receptores específicos en las mismas células que las producen o en otras diferentes. Son producidas, principalmente, por linfocitos y macrófagos en su estado activado. Según las células que las produzcan se denominan monoquinas (monocitos o macrófagos), interleuquinas (leucocitos en general) o linfoquinas (linfocitos). La acción de las distintas citoquinas suele ser redundante, son pleiotrópicas, actuando sobre distintos tipos celulares y, además, una misma célula puede presentar receptores para varias de ellas.

Las **interleuquinas** (IL) son ampliamente producidas durante estados inflamatorios y su función es regular la intensidad y duración de la respuesta inmune. Son producidas por la microglía y la astrogliía en el SNC (Hopkins y Rothwell, 1995).

Las **quimioquinas** son un pequeño grupo de citoquinas pro-inflamatorias que participan en el reclutamiento de células inflamatorias. Son liberadas por diferentes tipos celulares en respuesta a un daño y su función es atraer leucocitos a la zona de inflamación, donde inducen la activación celular.

Tanto las interleuquinas como las quimioquinas, aparecen en niveles elevados en el cerebro de pacientes de la enfermedad de Alzheimer, tanto de naturaleza pro- como anti-inflamatoria, como son las interleuquinas (IL1, IL4, IL6, IL8, IL10, IL13), TNF α y TGF β (Akiyama y col., 2000; Moore y O'Banion, 2002; Tuppo y Arias, 2005; Weisman y col., 2006; Heneka y O'Banion, 2007). El A β induce en las células astrogliales la producción de quimioquinas (Johnstone y col., 1999). De hecho, las formas fibrilares del A β son capaces de inducir la producción de productos neurotóxicos, citoquinas pro-inflamatorias y especies reactivas de oxígeno (McGeer y McGeer, 1995). Las características de las principales citoquinas se detallan a continuación:

- **IL1:** Es una citoquina inmuno-reguladora pro-inflamatoria que promueve la síntesis y procesamiento del APP, elevando así la producción de placas amiloides, incrementa la activación microglial y la producción de más IL1 en la microglía, contribuye al reclutamiento de linfocitos, además de favorecer la activación astrogliial, entre otras funciones. La IL1 está sobre-expresada en pacientes de la EA (Griffin y col., 1989; Mrak y Griffin, 2001; Griffin y Mrak, 2002; Griffin, 2006). Recientemente, se han publicado varios estudios en los que se considera que la IL1 también podría tener efectos neuroprotectores en las enfermedades neurodegenerativas (ver revisiones Shaftel y col., 2008; Fogal y Hewett, 2008). La sobre-producción de IL1 es un evento temprano en el transcurso de la deposición de placas amiloides, cuando las placas aún son difusas y no existen depósitos neuríticos (Akiyama y col., 2000).
- **IL4:** La IL4 se considera una citoquina pleiotrópica anti-inflamatoria y antagonista de la IL1. Es producida por los linfocitos CD4⁺ (junto con el INF γ) y actúa como factor de crecimiento auto- y paracrino, provocando su diferenciación hacia linfocitos Th2, que también producirán IL4 (Choi y Reiser, 1998; Gilmour y Lavender, 2008).
- **IL6:** Es una citoquina pleiotrópica que media la respuesta inmune y la reacción inflamatoria afectando al crecimiento y diferenciación de las células del SNC. Es sintetizada por la microglía, astrogliía (en presencia de TNF α), neuronas y las células endoteliales. La IL6 tiene un papel importante en la regulación de la supervivencia

neuronal. Aunque es capaz de inhibir la producción de INF γ , IL1 y TNF α , la IL6 tiene, en general, características pro-inflamatorias, induciendo proteínas de fase aguda, incrementando la permeabilidad vascular, la activación de linfocitos, astrogliía y microgliía, la síntesis de anticuerpos y actuando como pirógeno (ver revisión Akiyama y col., 2000; Weisman y col., 2006; Heneka y O'Banion, 2007).

- **IL10:** Se trata de una potente citoquina anti-inflamatoria que está implicada en la disminución del proceso inflamatorio durante la EA, de forma similar a la IL4, ya que ambas pueden suprimir la actividad de interleuquinas pro-inflamatorias (IL1, IL6 y otras citoquinas) inducidas por LPS y el A β *in vitro* e *in vivo* (Szczepanik y col., 2001).
- **TNF α :** El factor de necrosis tumoral es una citoquina pro-inflamatoria que es producida, principalmente, por macrófagos activados (microgliía) y linfocitos T en condiciones inflamatorias como en la enfermedad de Alzheimer (ver revisiones Akiyama y col., 2000; Perry y col., 2001; Tuppo y Arias, 2005; Weisman y col., 2006; Heneka y O'Banion, 2007), ya que en tejidos sanos suele ser indetectable (Bradley, 2008). Su papel es controvertido, ya que es capaz de promover tanto la supervivencia celular y proteger contra la toxicidad del glutamato y ROS, atribuyéndosele características neuroprotectoras, como de provocar la apoptosis neuronal al unirse a su receptor específico de muerte TNFR, presente en neuronas, microgliía y astrocitos (Tarkowski y col., 1999; Akiyama y col., 2000; Zhao y col., 2003; Tuppo y Arias, 2005; Heneka y O'Banion, 2007). Posee dos receptores, denominados TNFR1, que media principalmente en las vías de señalización pro-inflamatorias y de apoptosis, ya que se requiere su activación para la muerte neuronal inducida por el A β , y TNFR2, que está implicado en las vías de reparación tisular y angiogénesis (Perry y col., 2001; He y col., 2007; Bradley, 2008). La exposición a A β en cultivos microgliales provoca un aumento en los niveles de TNF α . El TNF α es un potente estimulador del factor de transcripción NF κ B, que promueve la expresión tanto de factores pro-inflamatorios, como la ciclooxigenasa, como factores pro-supervivencia, como el Bcl-2 (Akiyama y col., 2000). La neurotoxicidad inducida por TNF α requiere la participación de otras citoquinas, la generación de ROS y la producción microglial y neuronal de óxido nítrico a través de la activación de la enzima en su forma inducible iNOS (Weisman y col., 2006). En la corteza entorrinal del modelo triple transgénico para la EA existe una correlación entre la activación microglial y la expresión de TNF α (Janelins y col., 2005).
- **TGF β :** El factor de crecimiento transformante se trata de una citoquina anti-inflamatoria producida por muchos tipos celulares (neuronas, astrocitos y microgliía) y que actúa como factor de crecimiento interviniendo en el desarrollo, homeostasis y reparación de tejidos, estando implicada en la formación de cicatrices gliales. En la EA, se ha detectado en placas amiloides (Van der Wal y col., 1993), en el líquido cefalorraquídeo y en el suero de los pacientes de esta enfermedad, y está implicado en la respuesta frente a daños tisulares y astrocitosis, la respuesta inflamatoria y activación microglial, la producción de matriz extracelular, la distribución y acumulación de A β , la regulación de APP, ApoE y COX2 y la inhibición de la apoptosis (ver revisión Akiyama y col., 2000). Al igual que el TNF α , se le ha atribuido un papel dual en la respuesta inflamatoria. Por un

lado, el TGF β promueve el proceso microglial y la eliminación del A β depositado en placas (Wyss-Coray y col., 2001), mientras que, por otro lado, es un potente quimioatrayente de la microglía y puede incrementar la expresión de COX2. Estudios recientes muestran una mejora de la patología amiloide si se inhibe su señalización en monocitos y macrófagos (Town y col., 2008).

1.5.6. Radicales libres

Los radicales libres intervienen en la respuesta inflamatoria que se da en la enfermedad de Alzheimer, ya que el A β puede activar directamente el complejo NADPH oxidasa. Entre ellos se encuentran las especies reactivas de oxígeno (ROS), que pueden generar estrés oxidativo y estrés mitocondrial, y especies nitrogenadas, como el óxido nítrico (NO). Los radicales libres pueden ser producidos tanto por neuronas afectadas como por la microglía activada y la astrogliá. El NO es sintetizado por la sintasa del óxido nítrico, que posee varias isoformas: nNOS (neuronal) y eNOS (endotelial), ambas constitutivas, e iNOS ó NOS-II (inducible). La microglía y la astrogliá también son capaces de sintetizar NO en determinadas condiciones, siendo la principal fuente de producción de NO los macrófagos. En general, bajas concentraciones de NO promueven la supervivencia y proliferación celular, mientras que niveles más altos favorecen la parada del ciclo celular, la apoptosis y la senescencia (ver revisión Thomas y col., 2008). Aunque el NO funciona, generalmente, como neurotransmisor, el NO producido por la iNOS es citotóxico para microorganismos invasores y células tumorales, además de provocar vasodilatación en el hospedador. En la EA se ha detectado una mayor producción de NO, debido a la presencia de gran cantidad de proteínas nitrosiladas (Akiyama y col., 2000; Heneka y O'Banion, 2007). La expresión de iNOS ha sido detectada en astrocitos que rodeaban las placas de A β (Lee y col., 1993; Wallace y col., 1997), mientras que la microglía no es capaz de expresar iNOS en la enfermedad de Alzheimer, aunque sí se ha observado en otras, como el Parkinson o la esclerosis múltiple (Akiyama y col., 2000). Los animales transgénicos para la EA en los que se elimina el gen de la iNOS presentan un empeoramiento de la patología, ya que aumentan los niveles de A β insoluble, la degeneración neuronal y los fallos en el comportamiento (Colton y col., 2006b; Wilcock y col., 2008).

1.6. Modelos animales transgénicos de la enfermedad de Alzheimer

El empleo de modelos animales que expresan mutaciones humanas de genes patogénicos es una herramienta poderosa para la investigación biomédica, el ensayo de tratamientos potenciales, el conocimiento del desarrollo de la patología *in vivo*, así como la identificación de marcadores tempranos específicos de la enfermedad. La posibilidad de estudiar la evolución de la enfermedad desde los estadios más tempranos permite conocer los cambios neuropatológicos y los mecanismos celulares y moleculares que puedan desencadenar la aparición de la enfermedad. Esto es muy importante, ya que, actualmente, no se conocen las causas del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer de tipo esporádica

(90%), por lo que una buena aproximación es el empleo de animales transgénicos que porten las mutaciones encontradas en los pacientes de la enfermedad de Alzheimer de tipo familiar. El desarrollo de animales transgénicos que expresan diferentes mutaciones o que presentan diferentes promotores provoca la generación de múltiples animales con fenotipos distintos (ver revisión Duyckaerts y col., 2008).

Existen multitud de modelos transgénicos de la EA, desde modelos espontáneos de la enfermedad, como el empleo de monos ancianos, pasando por modelos invertebrados, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* o *Drosophila melanogaster*, hasta modelos *in vitro*, aunque los más empleados para el estudio de la EA son los modelos transgénicos murinos.

Aún no se ha conseguido generar un modelo murino que reúna todos los aspectos neuropatológicos de la EA. Esto, probablemente, refleja las limitaciones de emplear estos modelos para reproducir una enfermedad humana que se desarrolla durante varios años y que afecta a funciones cognitivas superiores. Sin embargo, existen líneas de ratones transgénicos que reproducen algunas de las características histopatológicas más importantes de la EA y que se utilizan para la realización de ensayo clínicos, encaminados a retrasar, detener o prevenir la enfermedad (Tabla 1.4).

1.6.1. Animales transgénicos PS1

En 1996, el grupo de Thinakaran y col., generó un animal transgénico con una mutación en el gen de PS1 asociada al Alzheimer familiar, en la que se produce una mutación de falta de sentido que provoca una deleción del exón 9 en el gen de la presenilina 1 (PS1 Δ E9; **S9**). Esta mutación, en humanos, incrementa la secreción del péptido A β y la formación de placas seniles congofílicas.

El animal transgénico Hu-PS1 (sobre-expresión del gen humano PS1; **S8-4**), generado por Borchelt y col., en 1997, posee unos niveles de ARNm de PS1 5 veces superiores que los animales transgénicos que sobre-expresan la forma humana de la presenilina-1 mutada (hPS1-A246E; N-5), aunque no incrementa los niveles de A β ₄₂ ni promueve el depósito de A β a edades avanzadas. Los animales hPS1-A246E (**N-5**) no presentan depósitos extracelulares, ni siquiera a los 12 meses de edad del animal (Borchelt y col., 1997). En general, los animales transgénicos para PS1 o PS2 (sobre-expresión de los genes humanos) no suelen tener las lesiones histopatológicas que presentan los pacientes de EA (Duff y col., 1996). Los animales transgénicos PS1 knock-out (**PS1_{ko}**) son inviables, ya que poseen déficits esqueléticos y daños en el SNC, como fallos en la neurogénesis y hemorragias (Shen y col., 1997).

1.6.2. Animales transgénicos APP

La identificación de la mutación de APP asociada al Alzheimer familiar permitió la generación de diferentes modelos animales que sobre-expresaban la forma mutada y no mutada del APP humano. Hoy en día existen más de 40 tipos diferentes de animales

transgénicos APP y más de 20 que expresan APP junto con otros genes relacionados, como PS1 y TAU (www.alzforum.org), como veremos más adelante.

El primer ratón transgénico APP que mostraba un patología amiloide fue desarrollado por el grupo de Games y col., en 1995. Este modelo, denominado **PDAPP**, posee la mutación V717F (Indiana). Presenta numerosos depósitos extracelulares fibrilares (10 veces más que los niveles endógenos) a partir de los 6 meses de edad en el hipocampo y a los 8 en la corteza cerebral, placas neuríticas, neuritis distróficas (entre los 10 y 12 meses), pérdida sináptica, astrogliosis y microgliosis. No presentan ovillos neurofibrilares ni pérdida neuronal.

En 1996, el grupo de Hsiao y col., generó otro ratón transgénico, denominado **Tg2576**, que sobre-expresa la isoforma APP695 con la doble mutación *Swedish* (K670N y M671L) bajo el control del promotor de la proteína prion de hámster, que no es únicamente específico de neuronas. Este animal expresa APP cinco veces más que el endógeno, aunque las primeras placas amiloides no aparecen hasta los 9-11 meses en la corteza entorrinal, frontal, temporal, el hipocampo, el presubiculo y el subiculo. Presenta pérdida sináptica y pérdida de memoria (9-10 meses), aunque no ovillos neurofibrilares ni pérdida neuronal.

El modelo **APP23** sobre-expresa la isoforma humana APP751 con la doble mutación *Swedish* (K670N y M671L) con el promotor Thy1 murino, que es específico de neuronas (Sturchler Pierrat y col., 1997; Novartis Pharma). Este animal expresa siete veces los niveles de APP endógeno y los primeros depósitos empiezan a los 6 meses. Aparece microgliosis y astrogliosis alrededor de los depósitos de A β , además de neuritis distróficas e hiperfosforilación de tau, aunque no aparecen ovillos neurofibrilares. Existe pérdida neuronal en la región CA1 del hipocampo, además de problemas en la capacidad de aprendizaje y memoria espacial (3 meses).

El modelo con la mutación APP sueca bajo el promotor de prion murino, denominado **C3-3**, generado por Borchelt y col., en 1996, no es capaz de desarrollar placas extracelulares incluso a los 18 meses de edad. Los animales transgénicos **CRND8** portan la mutación sueca del APP (K670N y M671L) y la indiana (V717F), bajo el promotor de prion de hámster. (Chishti y col., 2001). Desarrolla placas a los 3 meses de edad, ya que posee una alta producción de A β y una relación A β_{42} /A β_{40} muy alta.

1.6.3. Animales transgénicos PS1xAPP

Debido a que los animales transgénicos simples no mostraban la verdadera patología de la EA, se empezaron a generar animales doble transgénicos, empleando mutaciones en los genes de la presenilina-1 y de la proteína precursora amiloide.

El modelo **AP/PS** fue desarrollado por el grupo de Borchelt y col., en 1996. Se generó al unir animales transgénicos APP (C3-3), con la doble mutación sueca, y animales transgénicos que sobre-expresan la forma humana de la presenilina-1 mutada (hPS1-A246E; N-5). Estos animales expresan a los 9 meses la misma cantidad de depósitos extracelulares que los animales que portan sólo la mutación APP sueca a los 18 meses de

edad. Los animales **PSAPP**, obtenidos tras el cruzamiento de los animales transgénicos Tg2576 (APP695 Swedish) y los animales que sobre-expresan PS1 con la mutación M146L, presenta depósitos amiloides a los 6 meses de edad, en lugar de los 9 meses como presentaba el Tg2576 (Holcomb y col., 1998).

El animal doble transgénico PS1 (M146L, bajo el promotor HMG-CoA reductasa) x APP (hAPP751 con la doble mutación *Swedish* (K670N y M671L) y la mutación *London* V717I, bajo el promotor Thy1), objeto de estudio de este trabajo, generado por el grupo de Blanchard y col. (2003), presenta muerte neuronal de células piramidales en el hipocampo a partir de los 17 meses y de interneuronas desde los 6 meses de edad (Ramos y col., 2006). En este modelo **PS1_{M146L}xAPP_{751SL}** aparecen placas extracelulares entre los 3-4 meses, sobre todo en el hipocampo, la corteza entorrinal y el subículo, además de microgliosis y astrogliosis desde edades muy tempranas (4-6 meses). Sin embargo, no presentan ovillos neurofibrilares. El modelo **APP_{SL}PS1_{KI}**, que porta las mutaciones APP (Swedish y London) y PS1 (knock-in; M233T/L235P), desarrolla una patología muy agresiva, con una prominente pérdida neuronal en CA1 a los 10 meses de edad (Casas y col., 2004).

Existe un modelo que porta 5 mutaciones de la enfermedad de Alzheimer familiar, denominado **5xFAD**, que posee una deposición de A β muy acelerada (Oakley y col., 2006). Este animal PS1xAPP expresa las mutaciones Swedish (APP K670N/M671L), la Florida (I716V), la mutación London (V717I) y dos en el gen de la presenilina 1 (M146L y L286V). Posee acumulación de A β ₄₂ intracelular desde los 1,5 meses de edad y la deposición extracelular comienza a partir de los 2 meses, así como pérdida neuronal a los 9 meses de edad.

1.6.4. Animales transgénicos BACE

La sobre-expresión de BACE provoca un incremento de los niveles de A β , pero también incrementa la producción de los fragmento C-terminales de APP (Bodendorf y col., 2002). Los animales knock-out para BACE1 (**BACE_{KO}**) son animales viables y fértiles que no producen A β (Luo y col., 2001), aunque los animales tienen una conducta menos exploratoria que los controles. La mutación M671I en APP, correspondiente a la zona de corte de BACE también evita la formación de A β .

1.6.5. Animales transgénicos APPxBACE

La co-expresión APP y BACE (**APP_LxBACE**) incrementa la densidad de los depósitos de A β , pero decrece la severidad de la angiopatía amiloide, ya que genera un incremento de las formas N-truncadas del A β , que se acumulan, preferentemente, en el parénquima y no en los vasos (Willem y col., 2004). Los animales transgénicos BACE1 knock-out cruzados con animales PDAPP o con Tg2576 (**Tg2576xBACE_{KO}**; Luo y col., 2001) previenen la patología.

1.6.6. Animales transgénicos TAU

Los ovillos neurofibrilares sólo se encuentran en animales transgénicos que sobre-expresan la forma humana mutada de tau, aunque aparecen epítopes de tau hiperfosforilado en las neuritas distróficas en otros modelos. En la enfermedad de Alzheimer no aparece asociada ninguna mutación en el gen de tau, por lo que los modelos para tau no son útiles para conocer las causas de la enfermedad, aunque sí lo son para conocer su relación con el péptido A β en los animales transgénicos que desarrollan placas extracelulares (Duyckaerts y col., 2008). Sin embargo, en la demencia fronto-temporal sí aparecen mutaciones en tau. Si los ovillos aparecen en el sistema límbico, los síntomas se asemejan a la EA, pero si, por ejemplo, aparecen en las neuronas motoras, pueden provocar parálisis en el animal.

La línea de animales **ALZ7** expresa la isoforma de tau con cuatro repeticiones (4R) bajo el promotor murino Thy-1 (Gotz y col., 1995). Estos animales desarrollan axonopatía central y periférica, poseen axones dilatados, esféricos y filamentos helicoidales que no llegan a formar ovillos. La línea **8c** de animales transgénicos sobre-expresa tau humano con los 14 exones. Este animal presenta tau en neuritas y sinapsis, pero no en los cuerpos celulares (Duff y col., 2000).

Los animales **Htau** se obtienen por el cruce de animales tau knock-out y animales 8c (Andorfer y col., 2003). Ni los ratones TAU_{KO} ni los 8c desarrollan una patología tau. Los Htau expresan exclusivamente la 6 isoformas normales humanas, sin el tau murino. Los niveles de 3R son algo más altos que los de 4R. Estos animales presentan ovillos neurofibrilares y una extensa muerte celular (no correlacionada con los ovillos), aunque expresan niveles menores de tau humana que los animales 8c. Esto sugiere que el tau murino de los animales salvajes previene la agregación de la proteína tau humana sobre-expresada.

Existen otros animales transgénicos para tau que expresan varias mutaciones en el gen, como son P301L, P301S, V337M y G272V. Los animales transgénicos para la tau humana mutada en **P301L** presentan ovillos neurofibrilares a edades tempranas, aunque no existe muerte celular (Gotz y col., 2001). Los animales transgénicos para tau **P301S**, presentan filamentos de tau a los 6 meses, ovillos neurofibrilares a edades tempranas, atrofia en el hipocampo y la corteza entorrinal a los 9-12 meses, pérdida sináptica a los 3 meses, activación microglial y muerte celular (Allen y col., 2002; Yoshiyama y col., 2007).

1.6.7. Animales TAUxAPP

Los animales transgénicos APPxTAU, como el **Tg2576xP301L** generado por Lewis y col., en 2001, poseen depósitos de A β a la misma edad que los animales progenitores transgénicos simples Tg2576, aunque con una patología neurofibrilar incrementada en el sistema límbico y la corteza olfativa, sugiriendo un proceso de sinergia entre la patología amiloidea y la taupatía. Por otro lado, la reducción endógena de tau mejora o incluso rescata completamente los daños inducidos por el A β . Los animales hTau^{-/-} poseen mejores

resultados en las pruebas cognitivas que los hTau^{+/-}, los cuales obtienen, a su vez, mejores resultados que los ratones hTau^{+/+} (Duyckaerts y col., 2008).

1.6.8. Animales triple transgénicos PS1xAPPxTAU

En 2003, el grupo de Oddo y col., generó un animal transgénico **3xTg-AD** que portaba mutaciones en tres genes distintos: PS1_{KI} (M146L) x APP (mutación *Swedish* K670N y M671L) x TAU (P301L), bajo el promotor Thy-1.2 murino. Este modelo desarrolla tanto placas extracelulares amiloides (primero en la neocorteza y, después, en las áreas límbicas) como ovillos neurofibrilares (en el hipocampo y, posteriormente, en áreas corticales). Estos animales triple transgénicos expresan Aβ intracelular en las neuronas piramidales de CA1. Los depósitos amiloides se producen antes de la formación de los ovillos. También presentan disfunción sináptica, incluyendo déficit en la potenciación a largo plazo (no relacionada con la deposición de Aβ), aunque se produce antes de la patología amiloidea, cuando se observa el Aβ en el interior celular. El incremento de tau y de su hiperfosforilación no afecta al inicio ni la progresión de la patología amiloidea. Sin embargo, la expresión de los tres genes mutados a la vez no permite analizar por separado la implicación patológica que posee cada gen de forma individual en la enfermedad de Alzheimer.

Un año después, el grupo de Boutajangout y col. (2004), desarrolló un animal triple transgénico **PS1xAPPxTAU** sin mutaciones en tau (PS1 M146L, APP 751SL, hTau 3R). Estos animales desarrollan depósitos extracelulares a partir de los 2,5 meses, acumulación somatodendrítica de tau, neuritas distróficas, en los que existen epítopes de tau hiperfosforilados. No existen ovillos neurofibrilares ni a los 18 meses de edad.

1.6.9. Animales transgénicos inducibles

Un modelo de la enfermedad de Alzheimer inducible permite el estudio de la formación de las placas tras la inactivación de los transgenes (**hAPP695_{SI}**). Esto simula como si la patología amiloide no progresara, aunque tampoco revierte, ya que los depósitos extracelulares son estructuras muy estables que tardan mucho en disgregarse. La inactivación de los transgenes permite simular el paro de la producción de Aβ al igual que se esperaría tras la aplicación de un tratamiento farmacológico que inhibiera las enzimas secretasas. El núcleo amiloide produce la misma inflamación y está rodeado por neuritas distróficas (Jankowsky y col., 2005).

También se han generado animales transgénicos inducibles para tau, con el fin de analizar su progresión, mediante el empleo de una variante de tau humana reprimible. El grupo de SantaCruz y col., en 2005, generó el animal transgénico inducible para tau **rTg4510**. Se trata de un operón que responde a tetraciclina situado previo al gen de tau humano 4R P301L. Los animales desarrollan ovillos neurofibrilares con la edad, pérdida neuronal y fallos en el comportamiento. La administración de doxiciclina en la alimentación del animal suprime la expresión del gen. Esto permite recobrar el déficit cognitivo y

mantener estable la pérdida neuronal, aunque el número de ovillos continúa aumentando, por lo que sus efectos tóxicos no están relacionados con las lesiones visibles y su existencia no es suficiente para causar declive cognitivo o muerte neuronal en este modelo.

En la siguiente tabla se recogen los principales modelos transgénicos utilizados para el estudio de la EA (Tabla 1.4):

Tipo de animal	Línea	Mutación	Características	Referencia
PS1	S9	PS1 Δ E9	En humanos, incrementa la formación de placas.	Thinakaran y col., 1996
	S8-4	HuPS1	No presenta depósitos extracelulares	Borchelt y col., 1997
	N-5	hAPP A246E	No presenta depósitos extracelulares	Borchelt y col., 1997
	PS1 _{KO}	Sin PS1	Inviable	Shen y col., 1997
APP	PDAPP	APP _I (V717F)	Depósitos desde los 6 meses. Gliosis. Sin NFT.	Games y col., 1995
	Tg2576	APP695 _S (K670N/M671L)	Placas desde los 11 meses. Fallo sináptico. Sin NFT.	Hsiao y col., 1996
	APP23	APP751 _S (K670N/M671L)	Placas desde los 6 meses. Gliosis. Muerte celular. Sin NFT.	Sturchler Pierrat y col., 1997
	C3-3	APP _S (K670N/M671L)	Sin placas amiloides.	Borchelt y col., 1996
	CRND8	APP _{SL} (K670N/M671L y V717F)	Placas desde los 3 meses. Incremento de A β 42/A β 40.	Chishti y col., 2001
PS1xAPP	AP/PS	C3-3xN-5 APP _S y HuPS1 A246E	Depósitos extracelulares desde los 9 meses de edad.	Borchelt y col., 1996
	PSAPP	Tg2576 (695 _S) y PS1 (M146L)	Depósitos extracelulares desde los 6 meses de edad.	Holcomb y col., 1996
	PS1xAPP _{SL}	PS1 (M146L) y APP _{SL} (K670N/M671L y V717I)	Depósitos extracelulares desde los 3-4 meses de edad. Gliosis. Muerte de neuronas piramidales a los 17 meses de edad y de interneuronas a los 6 meses en el hipocampo.	Blanchard y col., 2003; Ramos y col., 2006
	APP _{SL} PS1 _{KI}	APP (751 _{SL}) y PS1 _{KI} (M233T/L235P)	Modelo de patología muy agresiva. Pérdida de neuronas muy temprana.	Casas y col., 2004
	5xFAD	APP _S (K670N/M671L), APP _F (I716V), APP _L (V717I), PS1 (M146L y L286V)	Niveles muy altos de A β 42 desde los 1,5 meses. Placas extra-celulares desde los 2 meses de edad.	Oakley y col., 2006
BACE	BACE	Sobre-expresión de BACE	Aumentan las formas amiloides y APP C-terminales.	Bodendorf y col., 2002
	BACE _{KO}	Sin BACE	Son viables y no presentan A β .	Luo y col., 2001

APPxBACE	APP _L BACE	APP _L (V717I) y sobre-expresión de BACE	Aumenta la densidad de las formas amiloides, aunque disminuye la angiopatía amiloide.	Willem y col., 2004
	Tg2576xBACE _{KO}	APP695 _S (K670N/M671L) sin BACE	Sin patología amiloide.	Luo y col., 2001
TAU	ALZ7	Sobre-expresión de 4R	Presentan axonopatía sin formación de NFT.	Gotz y col., 1995
	8c	Expresión de Tau humano	Tau aparece en neuritas y sinapsis, pero no en el soma.	Duff y col., 2000
	HTau	Tau _{KO} x8c	Más formas 3R que 4R. Existe muerte celular pero no NFT	Andorfer y col., 2003
	P301S	Tau P301S	Sin muerte celular y con NFT de aparición temprana.	Gotz y col., 2001
	P301S	Tau P301S	Filamentos a los 6 meses. Fallos sinápticos a los 3. Microgliosis y muerte celular. NFT a edades tempranas.	Allen y col., 2002; Yoshiyama y col., 2007
APPxTAU	Tg2576xP301L	APP695 _S (K670N/M671L) y Tau P301L	Placas a los 9 meses. NFT en el sistema límbico y la corteza olfativa.	Lewis y col., 2001
PS1xAPPxTAU	3xTg-AD	PS1 _{KI} (M146L), APP _S (K670N/M671L), TAU (P301L)	Presentan NFT y placas amiloides, además de fallos sinápticos.	Oddo y col., 2003
	PS1xAPPxTAU	PS1 (M146L), APP751 _{SL} , hTAU (3R)	Depósitos extracelulares desde los 2,5 meses y axones distróficos. Sin NFT.	Boutajangout y col., 2004
Inducible	hAPP695 _{SL}	hAPP695 _{SL}	Con la inhibición génica los depósitos amiloides no decrecen de tamaño.	Jankowsky y col., 2005
	rTg4510	Tau P301L (4R)	Presentan NFT y pérdida neuronal. La inhibición no evita la formación de nuevos NFT.	SantaCruz y col., 2005

Tabla 1.4. Resumen de los principales modelos transgénicos murinos para la enfermedad de Alzheimer.

En la tabla se muestra el tipo de animal transgénico, el nombre de la línea por el que se conocen, las mutaciones o genes sobre-expresados, las características patológicas más notables que presenta el animal y la referencia bibliográfica. PS1: presenilina-1; APP: proteína precursora amiloide; BACE: enzima de corte del APP en posición β; NFT: ovillos neurofibrilares; S: mutación sueca; L: mutación londinense; I: mutación indiana; F: mutación florida; KO: knock-out; KI: knock-in.

1.7. Corteza entorrinal

1.7.1 Límites anatómicos, citoarquitectura y subdivisiones

El sistema hipocampal está compuesto por la **formación hipocampal** y la **región parahipocampal**. La formación hipocampal consta de las áreas CA1, CA2 y CA3 del hipocampo propio, el giro dentado y el subículo. Estas regiones están altamente interconectadas y se diferencian de la región parahipocampal en que sólo poseen 3 láminas.

La región parahipocampal se divide en corteza entorrinal, corteza perirrinal, corteza postrrinal, presubículo y parasubículo. Estas áreas, a diferencia de las anteriores, poseen 6 láminas (Scharfman y col., 2000; Witter y col., 2000; Furtak y col., 2007).

La **corteza entorrinal** (CE) o área de Brodmann 28, denominada giro parahipocampal en primates, es un área de la corteza o lóbulo temporal considerada como la principal entrada y salida de las conexiones de la formación hipocampal a través de la vía perforante. La CE se denomina así porque está en la zona de la fisura rinal, de forma más acusada en los mamíferos no primates. La primera descripción que se conoce de la corteza entorrinal y su conexión con el hipocampo es la que realizó Ramón y Cajal a principios del siglo XX. Hoy en día, la CE se considera el punto de convergencia entre la información hipocampal y la proveniente de las áreas de asociación multimodal. Esta región cortical, junto con el hipocampo, posee un papel crucial en los procesos de memoria y aprendizaje. Ocupa la región ventro-caudal de ambos hemisferios, tiene forma de cápsula y está rodeada por varias áreas corticales. Anteriormente, contacta con la corteza amigdaloides y olfativa, como la piriforme. Lateral y medialmente, está bordeada por la corteza peri-amigdaloides y el núcleo cortical posterior de la amígdala. En la zona medial, se mezcla con estructuras que pertenecen a la formación hipocampal o parahipocampal, como son la transición amígdalo-hipocampal y el parasubículo. Los límites lateral y posterior son la corteza perirrinal y la corteza postrrinal o parahipocampal, respectivamente (Insausti y col., 1997; Van Groen, 2001; Canto y col., 2008) (Fig. 1.10).

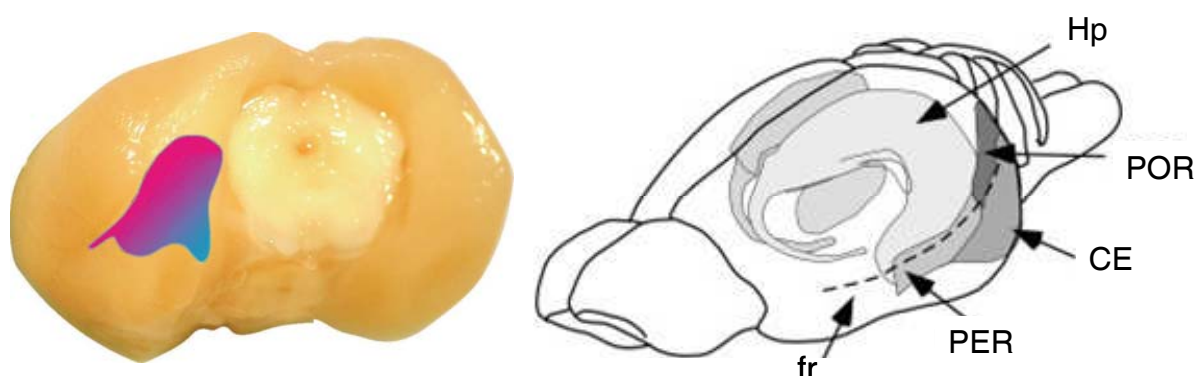


Figura 1.10. Localización de la corteza entorrinal en el cerebro de ratón. A la izquierda, la imagen muestra la localización de la CE en el cerebro de ratón visto desde atrás en ausencia del cerebelo (Tomado de Canto y col., 2008). A la derecha, esquema en vista tridimensional del cerebro de rata y la disposición de la corteza entorrinal (CE) respecto a la fisura rinal (fr) y rodeada por la corteza perirrinal (PER), la corteza postrrinal (POR) y el hipocampo (Hp). Modificado de Furtak y col., 2007.

Gracias a las características cito- y quimioarquitectónicas, la delimitación de la CE es más fácil de realizar. Posee células de mayor tamaño en la capa II que las cortezas adyacentes perirrinal y postrrinal, en las que no existe lámina disecans. Respecto a la composición química, se puede delimitar por los cambios en la intensidad de neuropilo marcado al emplear anticuerpos contra las proteínas ligadoras de calcio (CaBP) parvalbúmina (PV), calretinina (CR) o calbindina (CB), contra la acetilcolinesterasa o empleando las tinciones de Nissl o Timm (Wouterlood y col., 1995; Insausti y col., 1997;

Witter y col., 2000b; Van Groen, 2001; Canto y col., 2008). Mientras que la inmunotinción para PV y CB marca intensamente el neuropilo en la CE en comparación con las cortezas adyacentes (ver Fig. 2.2), la inmunotinción para la CR es menos intensa en la CE, aunque los plexos de las capas I y IV (lámina disecans) están más densamente teñidos (ver Fig. 2.3).

La laminación de la corteza entorrinal es considerada un prototipo de transición entre las 3 capas de la allocorteza y las 6 capas de la neocorteza, ya que funcionalmente forma parte de la allocorteza aunque posee las 6 capas de la neocorteza. Además, no siempre pueden diferenciarse bien las 6 capas entre sí. De las 6 capas, 4 capas son celulares (II, III, V y VI) y 2 plexiformes (I y IV). La capa I también se denomina capa molecular, mientras que la IV recibe el nombre de lámina disecans (Insausti y col., 1997; Van Groen, 2001; Canto y col., 2008). La composición neuronal específica de cada lámina se detalla más adelante.

Atendiendo a las proyecciones de la corteza entorrinal hacia el giro dentado, la CE se subdivide en dos grandes áreas, denominadas **corteza entorrinal lateral** (objeto de este trabajo) y la **corteza entorrinal medial**, que se corresponden con las áreas 28a y 28b de Brodmann, respectivamente (Dolorfo y Amaral, 1998a; Van Groen y col., 2003). La corteza entorrinal lateral y la medial se diferencian, además de en las conexiones que realizan, como se mencionará más adelante, en los tipos celulares que contienen y en las funciones en las que intervienen. La CE lateral posee las neuronas de capa II más pequeñas, en una disposición más densa y fina que la CE medial, en la que se disponen de forma más dispersa (Van Groen, 2001). La corteza entorrinal lateral, a su vez, se subdivide en corteza entorrinal dorsal lateral, dorsal intermedia y ventral intermedia, mientras que la corteza entorrinal medial se diferencia en corteza caudal y medial según su situación espacial, el tipo y distribución neuronal y las conexiones que reciben y envían (Fig. 1.11) (Insausti y col., 1997; Van Groen, 2001).

La **CE dorsal lateral** posee las células de la capa II de gran tamaño, formando grupos y algunas de ellas se introducen en la capa I. Caudalmente, puede apreciarse un pequeño hueco entre las capas II y III y su plexo se tiñe fuertemente con las tinciones de PV y CR. La **CE dorsal intermedia** se diferencia por tener una estrecha lámina II, con células densamente empaquetadas, formando islas, al igual que las células de capa III. La **CE ventral intermedia** posee una capa II más estrecha que la CE medial, mientras que la capa III es más ancha. Las neuronas de capa V están más dispersadas que en la III y, además, son más pequeñas. El **área medial de la CE medial** posee las capas I y II del mismo grosor. Las neuronas de capa II son más grandes, se suelen teñir más intensamente que las de capa III y están organizadas en grupos. La capa III es mucho más ancha que la II y parece estar formada por la unión de dos capas. Las neuronas de capa V son más grandes que en capa III. Finalmente, la **CE caudal** presenta las capas I y II del mismo grosor. Las células de la capa II son redondeadas de mediano tamaño, mayores y más densas que en capa III, y forman una banda continua. La capa III es más ancha que la II y en secciones sagitales, la capa IV es fácilmente apreciable (Van Groen, 2001).

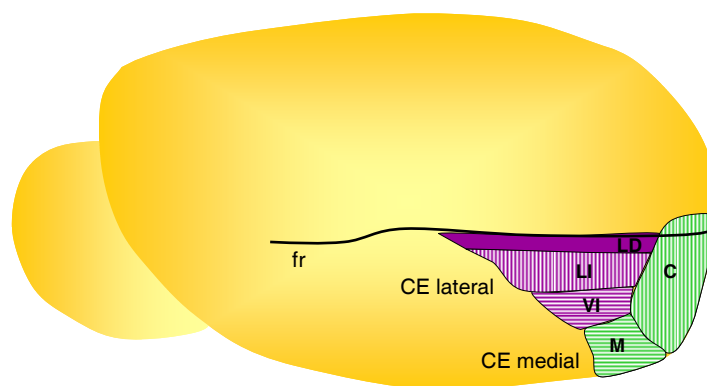


Figura 1.11. Representación de las subdivisiones de la corteza entorrinal en el cerebro de ratón. La corteza entorrinal, dispuesta bajo la fisura rinal (fr), se divide en CE lateral (en morado) y CE medial (en verde). La CE lateral se divide, a su vez, en lateral dorsal (LD), lateral intermedia (LI) y ventral intermedia (VI), mientras que la CE medial se divide en caudal (C) y medial (M). Modificado de Van Groen, 2001.

1.7.2 Conexiones extrínsecas

1.7.2.1. Conexiones de la corteza entorrinal con la formación hipocampal

Todas las zonas de la corteza entorrinal proyectan a las diferentes partes de la formación hipocampal (giro dentado, áreas CA1, CA2 y CA3 y el subículo) a través de la denominada **vía perforante** (Dolorfo y Amaral, 1998b; Witter y col., 2000; Van Groen y col., 2002; Deng y col., 2006; Witter, 2007; Scharfman, 2007; Kajiwara y col., 2008). La conexión entre la CE y el hipocampo se caracteriza por su distribución laminar (Amaral y Witter, 1989). Generalmente, los terminales sinápticos de la CE conectan con las espinas dendríticas de las células principales del hipocampo, generando sinapsis excitadoras. También contactan con las dendritas de las interneuronas hipocampales, formando tanto sinapsis inhibitorias como excitadoras (Witter y Amaral, 1991; Witter, 2007; Kajiwara y col., 2008; Canto y col., 2008). La vía perforante se origina, principalmente, desde las capas II (células estrelladas; Jones, 1994) y III de la CE, y termina en todas las áreas CA del hipocampo, el giro dentado y el subículo. Las neuronas de capa II llegan al giro dentado y a CA3, mientras que las neuronas de capa III proyectan hacia CA1 y el subículo, aunque algunas neuronas de la capa II proyectan, a través de haces colaterales, hacia el subículo. Algunas neuronas de capa V también contribuyen al componente de la capa III, mientras que las de capa VI contribuirían con las neuronas de capa II (Witter y col., 2000; Deng y col., 2006).

En el giro dentado (GD), los axones de la CE se distribuyen por las dos terceras partes externas de la capa molecular, donde se encuentran las dendritas distales de las células granulares. Esta conexión proviene, principalmente, de la capa II de la CE, mientras que las neuronas de las capas profundas (VI) inervan la región interna de la capa molecular del GD (Deller y col., 1996). Las células de la capa II también llegan a las porciones externas del estrato lacunoso-molecular de las áreas CA2 y CA3 (Fig. 1.12) (Witter y Amaral, 1991; Jones, 1993; Deller y col., 1996; Dolorfo y Amaral, 1998a; Van Groen y col., 2003; Deng y col., 2007; Witter, 2007).

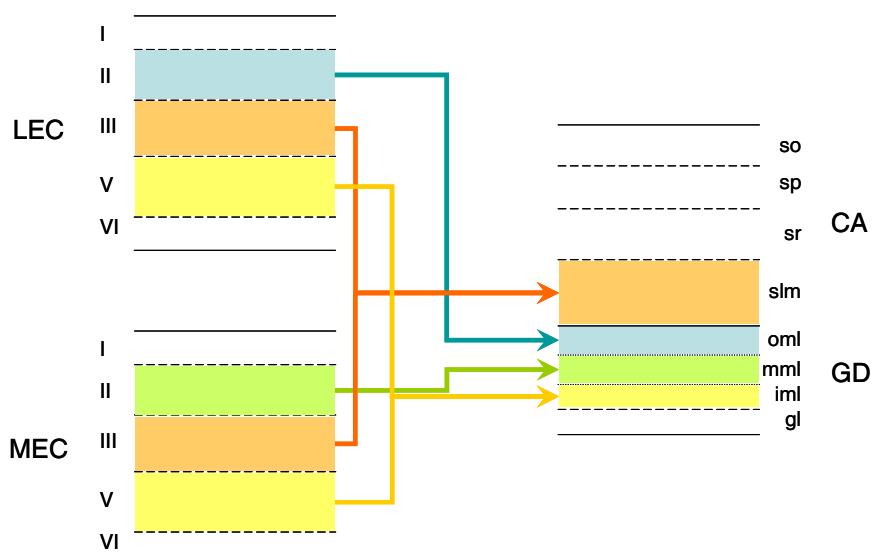


Figura 1.12. Esquema de las conexiones desde la corteza entorrinal lateral y medial hacia el hipocampo (vía perforante). LEC: corteza entorrinal lateral; MEC: corteza entorrinal medial; números romanos: capas de la CE; so: estrato oriens; sp: estrato piramidal; sr: estrato radiado; slm: estrato lacunoso-molecular; oml: capa molecular externa; mml: capa molecular media; iml: capa molecular interna; gl: capa granular; CA: regiones del cuerno de Ammon; GD: giro dentado.

La capa II de la CE lateral origina la vía perforante lateral, que termina en el tercio externo de la capa molecular del GD, mientras que la capa II de la CE medial, que forma la vía perforante medial, termina en el tercio medio de la capa molecular del GD. Las conexiones al GD se realizan de forma ipsilateral, mientras que las conexiones con CA1, CA3 y el subículo son bilaterales (Van Groen y col., 2003; Swards y Swards, 2003).

Por otro lado, la capa III proyecta hacia CA1 y el subículo y desde aquí vuelven a las capas profundas de la CE. Este circuito entorrinal-CA1-subículo permite un procesamiento ordenado de la información. Mientras que las conexiones de la CE y CA1 no suelen converger sobre las mismas células del subículo, sí suelen hacerlo las proyecciones desde la CE y CA3 hasta una misma neurona piramidal o una misma interneurona de CA1 (Canto y col., 2008).

La conexión intrínseca del hipocampo se denomina circuito trisináptico, ya que el hipocampo contiene tres sinapsis excitadoras en serie (Fig. 1.13). En la primera, las fibras perforantes derivadas de la capa II de la CE, que atraviesan el subículo y la fisura hipocámpal en su camino hacia el GD, contactando sobre las células granulares del GD. En la segunda, los axones de las células granulares, denominados fibras musgosas, forman sinapsis con las células piramidales de CA3, formando el estrato lúcido. Finalmente, los axones de CA3 de la vía colateral de Schaffer contactan sinápticamente con las células de CA1, las cuales proyectan, a su vez, hacia la CE tanto directa como indirectamente a través de subículo, cerrando de esta forma el circuito (Amaral y Witter, 1989).

Por lo tanto, CA1 recibe proyecciones desde la CE de forma directa (desde la capa III) e indirecta (desde la capa II, a través de la vía perforante, hasta el giro dentado, de aquí a CA3 y a través de la vía colateral de Schaffer) (Fig. 1.14). Esta convergencia de la información procedente de la CE a interneuronas y a neuronas piramidales posee

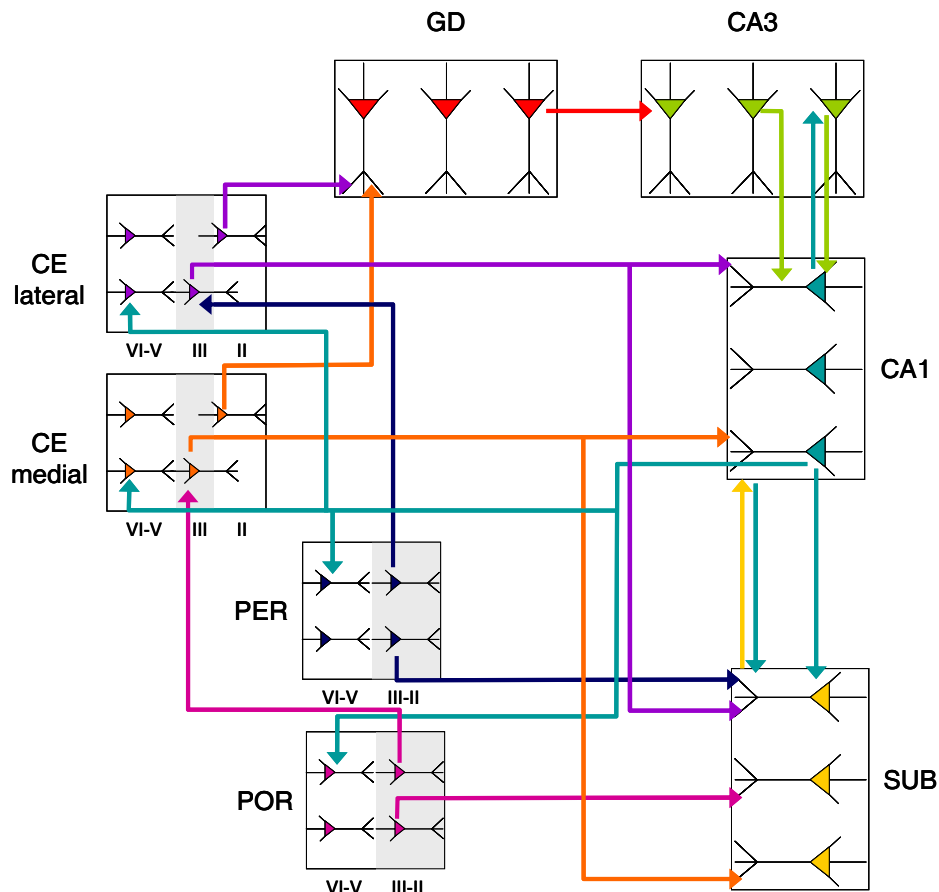


Figura 1.14. Esquema de las principales conexiones de la corteza entorrinal con la región hipocampal. Las neuronas de capa II de la CE conectan con el giro dentado, mientras que las de capa III lo hacen con las neuronas de CA1. La información fluye por las distintas regiones hipocampales a través del circuito trisináptico. Posteriormente, la información vuelve a las cortezas rinales. CE: corteza entorrinal, GD: giro dentado; CA1, 2 y 3: regiones del hipocampo propio; PER: corteza perirrinal; POR: corteza postrrinal; números romanos: capas de la corteza. Modificado de Witter y col., 2000b.

1.7.2.2. Conexiones de la corteza entorrinal con zonas corticales

La corteza **perirrinal** y parahipocampal (primates) o **postrrinal** (no primates) son las principales conexiones corticales de la CE. Las áreas temporales perirrinal, postrrinal y la corteza temporal de asociación emiten más de un cuarto de las proyecciones que llegan a la entorrinal mientras que la corteza auditiva de asociación emite un menor número de conexiones. En relación con la CE medial, la CE lateral recibe más entradas procedentes de las áreas 35 y 36 de la corteza perirrinal y menos de la postrrinal. Por su parte, el área 36 emite más proyecciones a la CE que el área 35. Las proyecciones desde el área 36 se originan en las capas II, V y VI, mientras que las emitidas por el área 35 y la corteza postrrinal se producen en las capas II y III, principalmente, aunque las capas profundas también contribuyen. En general, la corteza perirrinal proyecta a la zona rostro-lateral, mientras que la postrrinal proyecta, principalmente, a la zona dorso-caudal de la CE. La proyección hacia la corteza perirrinal proviene casi exclusivamente de la CE lateral, siendo mucho más fuerte hacia el área 35 que hacia la 36. Esta proyección se origina desde las

capas III y V de la CE lateral. La conexión de la CE hacia la corteza postririnal es diferente, ya que parte tanto desde la CE lateral como la medial, aunque proporcionalmente es inferior a la conexión con la perirrinal. Las aferencias desde la CE hacia la corteza postririnal proceden de capas superficiales y profundas (Burwell y Amaral, 1998a y b; Kerr y col., 2007). La conexión entre la corteza perirrinal y la CE es muy importante para la información que proviene desde la neocorteza y se dirige hacia el hipocampo. La entrada de aferencias excitadoras pueden superar la inhibición local, causando despolarización de las células de proyección, o bien, pueden activar interneuronas GABAérgicas que inhiban a otras neuronas GABAérgicas, como ocurre con las interneuronas calretinina positivas en el hipocampo. Ambas rutas provocan que las aferencias excitadoras que llegan desde las áreas corticales hasta las neuronas del circuito local produzcan una desinhibición de las neuronas principales de proyección hacia el hipocampo (Koganezawa y col., 2008).

Además, la CE recibe inervación del presubículo y el parasubículo. Las proyecciones desde el presubículo se realizan de forma bilateral y alcanzan las capas I y III de la CE medial, donde contactan con las neuronas cuyos somas están en estas láminas y con las dendritas apicales de las neuronas cuyos somas se encuentran en capa V (Van Haeften y col., 2000). Por su parte, el parasubículo lleva la información hasta la capa II de la CE lateral y medial (Caballero Bleda y Witter, 1993).

La otra entrada masiva de información a la CE proviene de la capa II de la corteza piriforme (corteza olfativa perteneciente a la región sensorial unimodal), aunque la CE lateral recibe más proyecciones de la corteza piriforme que la medial. La CE también recibe aferencias desde diferentes áreas de la corteza frontal, como son el área motora, la orbital, el área prelímbica y la infralímbica. Estas aferencias llegan hasta la CE lateral de forma equitativa, mientras que a la CE medial es la corteza motora la que envía un mayor número de proyecciones. Las regiones cinguladas son otra fuente de proyecciones hacia la CE, incluyendo el área cingulada, que llega principalmente a la CE medial, y el área retroespleneal, cuyas proyecciones se dirigen mayoritariamente a la CE lateral (Burwell y Amaral, 1998b; Kerr y col., 2007). En rata, las proyecciones desde la corteza cingulada y retroespleneal se dirigen, principalmente, a la zona más caudal de las áreas lateral, intermedia y medial de la CE (Insausti y col., 1997; Burwell y Amaral, 1998b; Jones y Witter, 2007; Kerr y col., 2007). Las áreas parietales, como son el área somato-sensorial y el área límbica, también proyectan hacia la corteza entorrinal. La CE lateral sólo recibe una pequeña parte de esta conexión, ya que es en la CE medial a la que llega la mayor proporción de conexiones desde el área somatosensorial y las áreas parietales de asociación (Burwell y Amaral, 1998b; Kerr y col., 2007). El área insular, con mayor porcentaje de proyecciones hacia la CE lateral que a la medial, y las áreas visuales y de asociación (en la corteza occipital) son también zonas de origen de proyecciones hacia la entorrinal (Canto y col., 2008).

Las principales aferencias corticales que llegan a la CE lo hacen en las capas superficiales (I-III), excepto las aferencias infralímbicas, prelímbicas y de las cortezas cingulada y retroespleneal, que llegan, preferentemente, a las capas profundas (IV-VI) (Jones y Witter, 2007).

Introducción

En general, las aferencias que reciben la CE lateral y medial, en porcentaje, son muy parecidas. Ambas reciben por igual aferencias de las cortezas piriforme, temporal y frontal. Sin embargo, la CE lateral recibe más proyecciones de la corteza insular mientras que la CE medial recibe un mayor número de conexiones desde las cortezas cingulada, parietal y occipital (Fig. 1.15).

Las aferencias corticales que emite la CE son recíprocas a las aferencias corticales que recibe, aunque en especies como la rata, las conexiones de la entorrinal con otras cortezas están limitadas y confinadas a las áreas que se encuentran cerca de la fisura rinal (Swanson y Kohler, 1986; Insausti y col., 1997; Canto y col., 2008). Las principales conexiones de la CE con las demás áreas corticales se producen, principalmente, desde las neuronas principales de capa V, exceptuando las conexiones infralímbicas y olfativas, que parten de las capas II y III (Insausti y col., 1997; Canto y col., 2008).

En resumen, las conexiones desde áreas corticales hasta la CE alcanzan las capas superficiales y profundas o sólo inervan de forma selectiva las capas profundas de la CE. Las células de las capas superficiales realizan las proyecciones extrínsecas hacia el hipocampo y llegan a otras regiones corticales. La vía perforante, que provee la ruta de conexión entre la CE y todas las áreas hipocampales, procede principalmente de las capas II y III de la CE, aunque también contribuyen algunas neuronas de las capas V y VI. Finalmente, la salida de información desde el hipocampo no sólo llega a las capas profundas de la corteza entorrinal, sino que también alcanza las capas superficiales, incluyendo las aferencias que se envían desde las capas profundas hacia las superficiales de la CE (Witter y col., 2000).

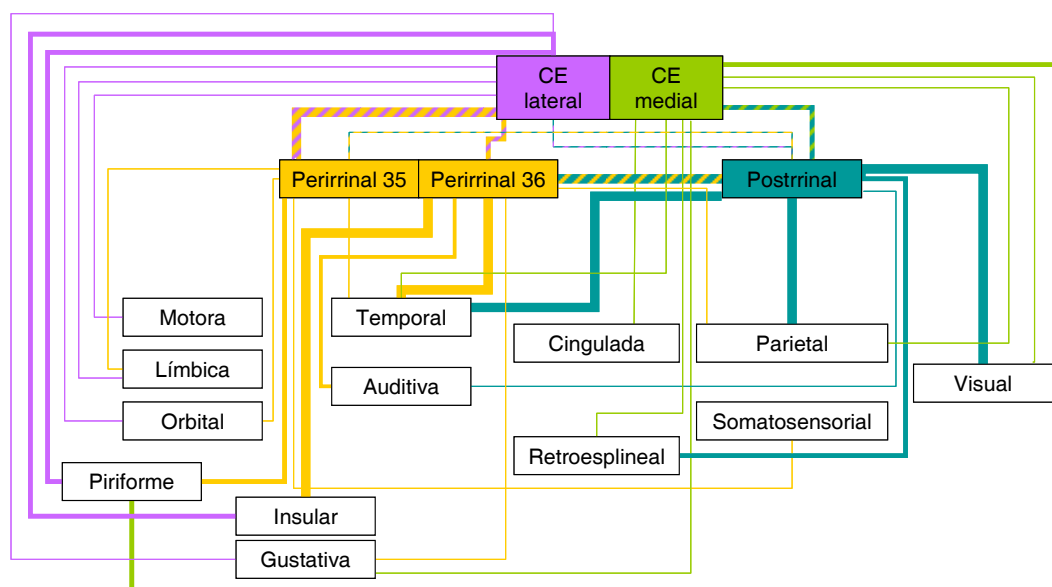


Figura 1.15. Esquema de las principales conexiones de la corteza entorrinal medial y lateral con las áreas neocorticales. La CE lateral (morada) recibe y envía, principalmente, conexiones de y a la corteza perirrinal (amarillo) y piriforme y, en menor medida, de y a la corteza insular. La CE medial (verde) recibe y envía sus principales aferencias desde y a la corteza postrinal (azul) y piriforme y, además, desde y hacia las áreas retroespleneal, parietal y temporal. Las líneas de mayor calibre indican una mayor densidad de fibras en ambos sentidos. Modificado de Burwell y Amaral, 1998b.

1.7.2.3. Conexiones de la corteza entorrinal con zonas subcorticales

La CE posee conexiones con el prosencéfalo basal, el claustró, la amígdala, los ganglios basales, el tálamo, el hipotálamo y con el tronco del encéfalo. Además, envía proyecciones al núcleo acumbens y recibe proyecciones desde el área tegmental ventral. Toda la CE realiza conexiones recíprocas con el claustró. Las proyecciones desde el prosencéfalo contactan en las capas II y V de la CE. La conexión entorrinal con la amígdala es muy extensa, aunque las regiones rostrales están más fuertemente interconectadas con la amígdala que las caudales. Las proyecciones de la amígdala terminan, principalmente, en la capa III de la CE y las proyecciones desde la CE hacia la amígdala se originan desde la capa V. También recibe una gran entrada de proyecciones procedentes de los núcleos basales lateral y accesorio. La CE también está conectada con estructuras talámicas e hipotalámicas. La principal conexión desde el tálamo proviene de los núcleos de la línea media (reuniens, paratenial y periventricular), aunque también posee conexiones con el núcleo anteromedial del tálamo y el ventromedial del hipotálamo. Otra aferencia que recibe la CE se produce desde el mesencéfalo, específicamente, desde el núcleo dorsal y medial del rafe y del núcleo cerúleo (ver revisiones Jones, 1993; Canto y col., 2008).

1.7.3 Conexiones intrínsecas

Las conexiones intrínsecas de la CE se dividen en tres grupos de elementos: elementos que reciben entradas, elementos que proveen salidas y elementos que contribuyen a la arquitectura intrínseca del área. Las funciones de estos tres elementos no necesariamente tienen que ser realizadas por neuronas diferentes. Pueden existir neuronas que realicen varias de estas acciones o existir neuronas especializadas para cada función (Canto y col., 2008).

En la CE existen conexiones verticales y horizontales tanto en las capas superficiales como en las profundas, por lo que las células de las capas I-III y IV-VI están funcionalmente interconectadas (Kohler, 1986; Burwell y Amaral, 1998a; Dolorfo y Amaral, 1998a; Gloveli y col., 2001; Van Haeften y col., 2003; Koganezawa y col., 2008), aunque la activación de las capas profundas es suficiente para activar al giro dentado (Koganezawa y col., 2008). La organización intrínseca entorrinal posee implicaciones importantes para el procesamiento de la información que procede del hipocampo. Existe una organización laminar de las aferencias, ya que muchas de ellas terminan en las capas I-III, mientras que otras, preferentemente, terminan en las capas profundas de la CE. Las dendritas de las neuronas de capas profundas se expanden fuera de estas capas (hacia las superficiales), mientras que las de las neuronas de capas superficiales se encuentran mayoritariamente confinadas a estas capas. Esto significa que las aferencias que terminan en las capas superficiales pueden realizar sinapsis tanto con las neuronas de capas superficiales como profundas, mientras que las que terminan en las capas profundas probablemente no tengan acceso a las neuronas de las capas superficiales (Fig. 1.16). Sin embargo, la existencia de inervaciones colaterales permite la llegada de la información desde las capas profundas a

Introducción

las superficiales. Las aferencias que terminan en las capas profundas, por lo tanto, tienen acceso indirecto a las células de las capas superficiales (Jones, 1993). Las proyecciones que parten de las capas superficiales se distribuyen hacia las capas I a III, aunque son menos abundantes en la capa II, donde son de tipo varicoso y tienen un calibre pequeño, mientras que son más abundantes en capa I, pero no suelen terminar en las capas profundas. Las proyecciones que se originan en las capas profundas de la CE proyectan, principalmente, a las capas I y III, aunque las proyecciones hacia la capa I son menos densas que hacia las capas V y VI (Dolorfo y Amaral, 1998b). Las neuronas de capa V poseen axones colaterales que ascienden y atraviesan la lámina disecans para ramificarse entre la capa I y la II y en la capa III, donde realizan sinapsis asimétricas (excitadoras desde las neuronas piramidales) con las espinas dendríticas tanto de neuronas principales como de interneuronas. Las sinapsis simétricas (inhibidoras desde las neuronas horizontales) con los ejes dendríticos son menos abundantes. Por lo tanto, las proyecciones sinápticas desde las capas profundas hacia las superficiales son, mayoritariamente, excitadoras (Gloveli y col., 2001; Van Haeften y col., 2003). Las proyecciones procedentes del subículo contactan con las neuronas e interneuronas de capa V y esto provoca una activación de las neuronas de capas superficiales (Kloosterman y col., 2003; Van Haeften y col., 2003). Por lo tanto, la comunicación existente desde las capas profundas de la CE (zona de llegada de aferencia desde el hipocampo) a las superficiales (zona de salida de las eferencias hacia el hipocampo), permite la interacción entre las vías de entrada y salida del hipocampo, generando una reentrada de la información en un bucle cerrado, por lo que la información es almacenada dinámicamente en un corto periodo de tiempo, lo que facilita modificaciones sinápticas necesarias para el almacenamiento de la información (Kloosterman y col., 2003).

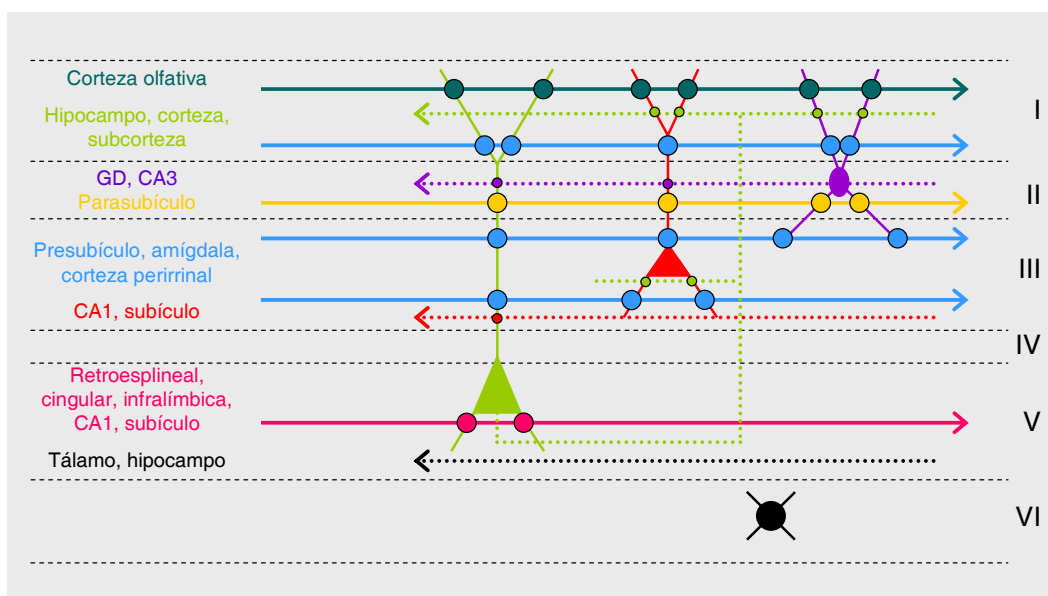


Figura 1.16. Representación de la distribución laminar e interacciones sinápticas de las aferencias entorrinales. Las diferentes aferencias aparecen como flechas continuas de diferentes colores. Las principales eferencias de las células principales se muestran en flechas discontinuas e indican la capa desde donde parten. Los círculos indican los contactos sinápticos. La capa V posee una gran capacidad de integración de las señales de entrada, salida y con las otras capas de la CE. Modificado de Canto y col., 2008.

En la Fig. 1.16 se muestra un esquema de la distribución laminar e interacciones sinápticas que se producen en la CE, indicando las capas de llegada y salida de las principales conexiones de la CE desde y hacia la formación hipocampal y las distintas regiones corticales y subcorticales.

1.7.4. Tipos neuronales corticales

La CE, como se ha mencionado anteriormente, es un área de transición entre la neocorteza y la allocorteza, aunque sus componentes celulares son muy similares a los de la neocorteza. Las neuronas corticales se dividen, principalmente, en dos grandes grupos: las **neuronas principales**, que suponen la gran mayoría (70-85%) y las neuronas no piramidales o **interneuronas**, que constituyen el 15-30% restante. La mayoría de las interneuronas de la corteza cerebral son de naturaleza GABAérgica, como veremos a continuación.

Las neuronas corticales se agrupan en dos tipos principales: las neuronas espinosas y las neuronas con pocas espinas o lisas. Las neuronas espinosas incluyen las neuronas piramidales y las células estrelladas con espinas, caracterizadas por formar sinapsis asimétricas excitadoras de naturaleza glutamatérgica. Las neuronas piramidales son el tipo neuronal mayoritario y se encuentran distribuidas entre las capas II y VI de la corteza. La mayoría de las células estrelladas con espinas son interneuronas y se encuentran en las capas intermedias de la corteza cerebral. Las neuronas con pocas espinas o lisas son interneuronas que forman sinapsis simétricas inhibitorias, de naturaleza GABAérgica y una pequeña población de interneuronas no GABAérgicas. Las interneuronas lisas se encuentran repartidas por todas las capas de la corteza y forman un grupo heterogéneo desde un punto de vista morfológico y fisiológico (DeFelipe y Fariñas, 1992; DeFelipe y col., 2002).

1.7.4.1. Neuronas principales (DeFelipe y Fariñas, 1992)

Las neuronas principales, piramidales o de proyección de la corteza cerebral son las neuronas más abundantes (70-85%, según el área cortical y la especie). Son células con axones largos cuyos somas se encuentran localizados en todas las capas corticales excepto en capa I. Las células principales o piramidales son las únicas neuronas de proyección de la corteza cerebral y las más abundantes. Son heterogéneas en el tamaño y forma del soma, la arborización dendrítica, la densidad de espinas, el patrón de axones colaterales y las zonas de proyección, así como en la variedad de tipos de sinapsis que reciben. Aún así, las células piramidales pueden dividirse en células con una morfología típica y células piramidales atípicas. Las células piramidales típicas se caracterizan por tres características, no exclusivas:

- Poseen un soma piramidal u oval y desde el polo superior parte una gran dendrita apical que se dirige radialmente hacia la piamadre, alcanzando la capa I, donde forma un penacho de arborizaciones oblicuas. La longitud de la dendrita apical depende de la

profundidad a la que se encuentre el soma del que parte, aunque no todas las dendritas de las neuronas de las capas profundas llegan hasta la capa molecular. Desde la base, emerge un sistema de largas dendritas basales que se extienden de forma lateral o hacia abajo. Frecuentemente, se observan dendritas más finas que parten del soma que están, generalmente, orientadas de forma horizontal.

- Desde la base del soma parte el axón hacia abajo y se dirige hacia otra área cortical. Durante el recorrido del axón a lo largo de la columna cortical, aparecen varias colaterales, que son los principales componentes del circuito intracortical, y se distribuyen localmente alrededor del soma, vertical y horizontalmente.
- Todas las superficies dendríticas están cubiertas por espinas, excepto los segmentos proximales que provienen directamente del soma.

Las células piramidales atípicas poseen un patrón de arborización dendrítico, una forma del cuerpo celular, una densidad de espinas y/o unas características axonales diferentes. Las células piramidales modificadas de capa II tienen una dendrita apical muy corta o carecen de ella. Las células piramidales con múltiples dendritas apicales aparecen, generalmente en capa V. Suele deberse a que arborizan muy cerca del soma, aunque en ocasiones pueden tener dos dendritas apicales. Las células piramidales modificadas de las capas profundas poseen somas variados (oval, triangular o fusiforme), suelen aparecer en capa V-VI y se dividen en: células piramidales invertidas, que dirigen su dendrita principal hacia la sustancia blanca; células piramidales horizontales, cuya dendrita principal se orienta de forma horizontal; las neuronas fusiformes verticales y horizontales, cuyas dendritas principales parten de los polos de su cuerpo fusiforme, orientándose de forma vertical u horizontal. Las células principales sin dendritas o con pocas espinas dendríticas suelen aparecer en capa V y poseen un axón con una alta velocidad de conducción, a diferencia de las neuronas piramidales espinadas. Las células piramidales de proyección pura poseen axones desprovistos de axones colaterales intracorticales. Las células piramidales intrínsecas poseen axones que no abandonan la corteza, aparecen en capas II, III y V y son diferentes a las neuronas con axones en arcadas recurrentes (en capa IV). Su dendrita apical es rudimentaria y posee un sistema de dendritas basales poco desarrolladas.

1.7.4.2. Interneuronas

Las interneuronas o neuronas no piramidales, son un grupo muy heterogéneo de células que constituyen el 15-30% de las neuronas corticales, aunque el porcentaje de cada tipo de interneurona varía según la especie, el área cortical y la capa. Poseen una morfología, fisiología y características moleculares y sinápticas muy diversas (Fairén y col., 1984; McCormick y col., 1985; DeFelipe, 1993; Kawaguchi y Kubota, 1997; Cauli y col., 1997; Gonchar y Burkhalter, 1997; Gupta y col., 2000; Wang y col., 2002; DeFelipe, 2002; Markram y col., 2004; Gonchar y col., 2008), además de un origen cortical diferente (ver Xu y col., 2003 y Wonders y Anderson, 2006).

Sin embargo, las interneuronas inhibitoras poseen muchas características comunes que las distinguen de las neuronas piramidales. Poseen dendritas sin espinas, pueden recibir en el soma tanto sinapsis excitadoras como inhibitoras y los axones de las neuronas inhibitoras suelen arborizar en una columna cortical y proyectar lateralmente a otras columnas, pero no suelen proyectar hacia la sustancia blanca para contactar con otras regiones distantes (Fairén y col., 1984). Todas las interneuronas tienen una arborización axonal más o menos densa distribuida cerca del cuerpo celular. Algunas de ellas, además, poseen axones colaterales largos horizontales o verticales (DeFelipe, 2002). Se denominan, en general, neuronas de circuito local. Existen diferentes tipos de neuronas inhibitoras según la zona con la que contactan (zonas dendríticas, soma o axón) (DeFelipe, 1997; Markram y col., 2004). La mayoría de las interneuronas forman sinapsis simétricas con células piramidales u otras interneuronas, excepto las células en candelabro, que sólo forman sinapsis con neuronas piramidales (DeFelipe, 2002). Las interneuronas también pueden ser excitadoras, como las células estrelladas con espinas, que poseen una arborización dendrítica en forma de estrella y son de naturaleza glutamatérgica. Aunque comparten muchas características con las neuronas piramidales, no poseen un prominente árbol dendrítico apical. Las interneuronas bipolares también producen péptidos excitadores (Markram y col., 2004).

Las interneuronas que producen GABA (ácido γ -aminobutírico) como neurotransmisor son muy heterogéneas en cuanto a la morfología somática, dendrítica y axonal y, además, son las más abundantes (DeFelipe, 2002). Según la “*terminología Petilla*”, la nomenclatura de las interneuronas GABAérgicas de la corteza cerebral, incluyendo neo-, paleo- y arquicorteza, debe realizarse según las siguientes características (Petilla Interneuron Nomenclature Group, 2008):

- Características morfológicas: soma (tipo, tamaño, orientación) (Fig. 1.17 A), dendrita (polaridad de la arborización, longitud de las ramas, estructura, elementos postsinápticos) (Fig. 1.17 B), axón (segmento inicial, trayectoria, forma del terminal, longitud de las ramas, botones, dianas sinápticas), conexiones (eléctrica y química, fuente, localización y distribución)
- Características moleculares: factores de transcripción, neurotransmisores o enzimas que los sintetizan, neuropéptidos, proteínas ligadoras de calcio, receptores (metabotrópicos o ionotrópicos), proteínas estructurales, marcadores de la superficie celular, canales iónicos, conexinas, transportadores (de membrana plasmática o vesiculares).
- Características fisiológicas: parámetros pasivos (potencial de membrana en reposo, oscilación y resonancia, rectificación), medidas del potencial de membrana (amplitud, umbral, longitud de onda, hiperpolarización y despolarización), propagación dendrítica, plató de despolarización, patrón de disparo (comportamiento oscilatorio y resonante, respuesta a la despolarización), respuesta a la hiperpolarización (rectificación, rebote), respuesta postsináptica (espontánea y evocada, porcentaje de subtipos de receptores, suma espacial y temporal, plasticidad a largo y corto plazo, uniones gap).

Para la clasificación de las interneuronas GABAérgicas en este trabajo hemos empleado características tanto morfológicas como moleculares (ver Markram y col., 2004).

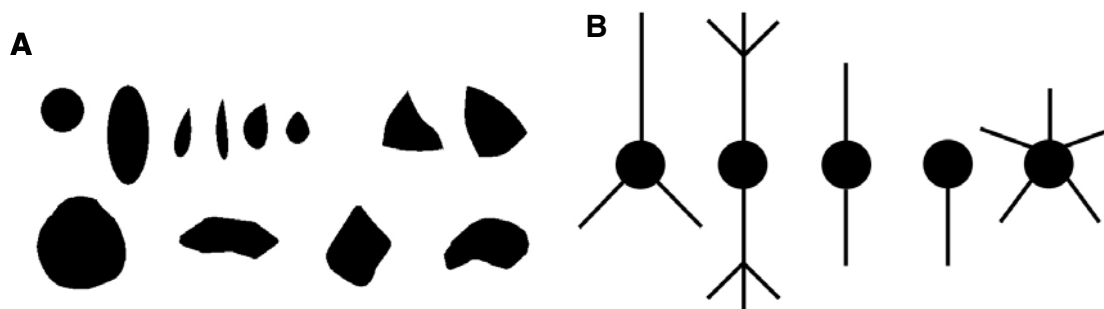


Figura 1.17. Característica somato-dendríticas de las interneuronas corticales. Dibujos esquemáticos que muestran ejemplos de (A) los tipos de somas (redondo, fusiforme, triangular o piramidal, poligonal, otro) y (B) de la polaridad de la arborización dendrítica (unipolar, bidireccional (radial o tangencial), biperacheado, bipolar, multipolar, otro). Tomado de Petilla Interneuron Nomenclature Group, 2008.

1.7.4.2.1. Tipos de interneuronas según sus características morfológicas (Fig. 1.18-1.19)

- **Células en cesto** (*Basket cells*). Aproximadamente, el 50% de todas las interneuronas inhibitoras son células en cesto. Su diana es el soma y las dendritas proximales de las neuronas piramidales y las interneuronas (Wang y col., 2002). Se denominan así porque forman una especie de red alrededor del soma de la célula piramidal, a modo de cesto, formada por la invasión de varias células en cesto. Expresan muchos neuropéptidos y dos proteínas ligadoras de calcio, parvalbúmina (PV) y calbindina (CB). Según su morfología dendrítica y axonal, se subdividen en (ver Wang y col., 2002):
 - *Células en cesto grandes*. Son las células en cesto clásicas. Poseen dendritas multipolares, sin espinas y grandes. Sus arborizaciones axonales puede inhibir a células lejanas (Wang y col., 2002). Son la principal fuente de inhibición lateral a través de las columnas corticales. La arborización axonal es escasa, con una baja densidad de botones. La morfología somato-dendrítica suele ser multipolar y pueden expresar CB, PV (Gonzalez Albo y col., 2001), colecistoquinina (CCK) (Kawaguchi y Kondo, 2002), neuropéptido Y (NPY) y, en raras ocasiones, somatostatina (SOM) y calretinina (CR), pero nunca péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Markram y col., 2004).
 - *Células en cesto pequeñas*. No poseen espinas. Son interneuronas que contactan en el soma con arborizaciones axonales densas y altamente varicosas. Su morfología somato-dendrítica puede ser multipolar, biperacheada o bipolar, según la capa. Se diferencian fácilmente de las anteriores por sus frecuentes ramificaciones y axones curvados. Forman el mayor número de sinapsis con las neuronas principales. A diferencia de las demás células en cesto, éstas siempre expresan VIP, pero no NPY (Wang y col., 2002).
 - *Células en cesto nido*. Son interneuronas con dianas somáticas (Wang y col., 2002). Se denominan así porque la cesta perisomática que forman tiene forma de

nido de ave. Poseen características intermedias de las anteriores, pero tienen ramificaciones menos frecuentes y largos axones colaterales con baja densidad de botones. No suelen expresar CR y nunca expresan VIP (Wang y col., 2002; Markram y col., 2004).

- **Células en candelabro** (*Chandelier cells*). Son interneuronas que inervan axones (Fairén y Valverde, 1980). Pueden ser multipolares o bipenacheadas. Poseen una alta densidad de botones sinápticos y las porciones terminales de sus axones forman filas cortas verticales de botones, asemejándose a un candelabro. Aparecen en capas II-VI y expresan PV y/o CB (DeFelipe y col., 1989). Las células en candelabro de la corteza temporal positivas para PV no expresan CB, CR ni SOM (Gonzalez Albo y col., 2001).

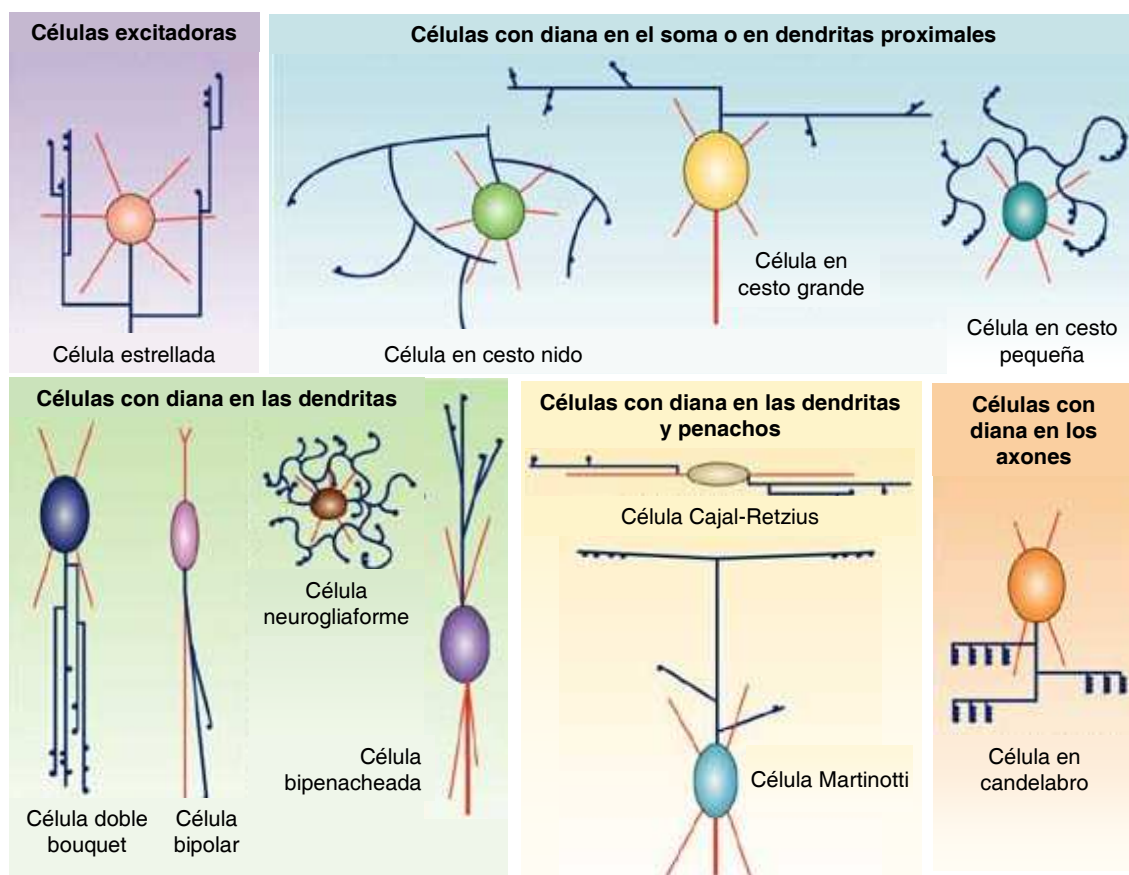


Figura 1.18. Diversidad anatómica de interneuronas corticales. El esquema resume las principales características anatómicas de las interneuronas corticales. Las dendritas aparecen en rojo, los axones en azul y los botones axonales como puntos azules. Las interneuronas están orientadas con la superficie pial arriba y la sustancia blanca hacia abajo. Modificado de Markram y col., 2004.

- **Células de Martinotti** (*Martinotti cells*). Se encuentran en las capas II-VI y están especializadas en proyectar sus axones hacia la capa I (Fairén y col., 1984; DeFelipe, 2002), donde inhiben los penachos de dendritas de las neuronas piramidales. Sus axones pueden proyectar también horizontalmente en la capa I e inhibir a las dendritas de neuronas cercanas o de columnas distantes. Sus dianas no son únicamente las dendritas distales, también inervan las dendritas proximales, las dendritas perisomáticas y los somas. Las células de Martinotti de las capas profundas pueden inervar

selectivamente a las neuronas de capa VI, por lo que poseen múltiples dominios y capas como diana. Suelen ser bipenacheadas, con un árbol dendrítico elaborado y sus axones forman botones espinosos (Markram y col., 2004; Silberberg y Markram, 2007). Siempre expresan SOM y nunca PV o VIP. Algunas células de Martinotti coexpresan, junto con SOM, CB, CR, NPY o CCK (Wang y col., 2004; Markram y col., 2004; Kawaguchi y Kubota, 1997). Normalmente, coexpresan sólo un marcador junto con SOM y, rara vez, coexpresan 3 marcadores (SOM/NPY/CB, SOM/NPY/CR ó SOM/CCK/CB, menos frecuente) (Wang y col., 2004; Gonchar y col., 2008). La combinación de marcadores parece estar asociada con el tipo de disparo de la célula.

- **Células bipolares** (*Bipolar cells*). Son células pequeñas con soma en forma de huso u oval y dendritas bipolares estrechas o bipenacheadas, que se extienden verticalmente hacia capa I y bajan hasta la VI. Su axón parte de una de las dendritas primarias y forma una banda estrecha que cruza todas las capas corticales. Pueden ser excitadoras, liberando únicamente VIP o inhibitoras, liberando GABA, aunque también expresen VIP. Su densidad de botones sinápticos es baja comparada con otras neuronas, por lo que contactan con pocas células, principalmente en las dendritas basales de las neuronas piramidales. Las células bipolares se encuentran en capas II-VI y expresan CR y VIP. Las CR positivas de la corteza temporal de humanos no expresan PV, CB ni SOM (Gonzalez Albo y col., 2001).
- **Células doble bouquet** (*Double bouquet cells*). Generalmente tienen una morfología dendrítica bipenacheada. Se caracterizan por tener un cilindro axonal fascicular apretado que se asemeja a una cola de caballo (DeFelipe y col., 1990). Las colaterales son muy varicosas y forman paquetes columnares inusualmente más finos que el axón principal, pudiendo extenderse a través de todas las capas corticales. Suelen inhibir las dendritas basales de las neuronas principales (DeFelipe y col., 1990). Los axones se ramifican frecuentemente y están densamente cubiertos por botones. Inervan principalmente dendritas (espinas y ejes). Aparecen en capas II-V, aunque abundan en las capas superficiales. Expresan CB, que suele co-expresarse con CR. También expresan VIP, a veces junto con CR (Kawaguchi y Kubota, 1997) y, además, pueden coexpresar CCK, pero no PV, SOM o NPY. Sin embargo, en la corteza temporal de humanos las células doble bouquet CB positivas no expresan PV ni CR, aunque sí SOM y las que expresan CR, coexpresan CB pero no PV ni SOM (Gonzalez Albo y col., 2001).
- **Células bipenacheadas** (*Bitufted cells*). Son similares a las células bipolares y doble bouquet, ya que suelen tener un soma ovalado y sus dendritas primarias parten de polos opuestos, formando dos penachos. Sin embargo, se diferencian por tener un axón más ancho horizontal que cruza la columna cortical. La proyección vertical es también menos extensa y llega, principalmente, a las capas vecinas. Poseen una diana dendrítica y se encuentran en las capas II-VI. Pueden expresar CB, CR, NPY, VIP, SOM y CCK, pero nunca PV (Markram y col., 2004).

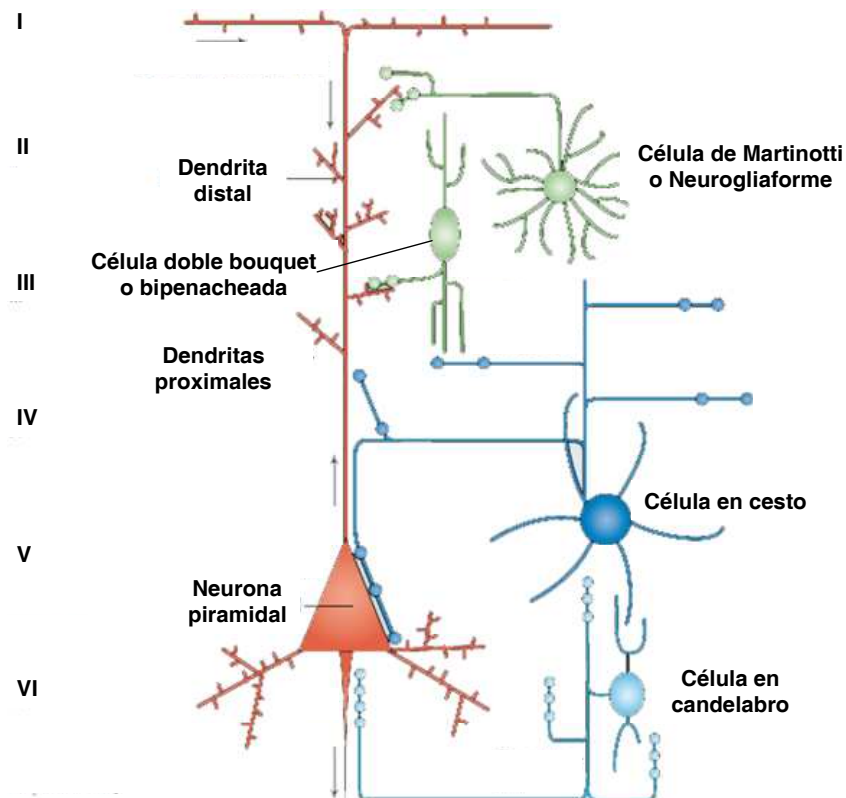


Figura 1.19. Conexión sináptica de las interneuronas corticales con las neuronas piramidales. Las células de Martinotti y las neurogliaformes contactan con las dendritas distales, al igual que las células doble bouquet y las bipenacheadas. Las células en cesto tienen su diana en el soma o en las dendritas proximales de las neuronas piramidales y las células en candelabro poseen como diana el axón de las neuronas piramidales. Modificado de Huang y col., 2007.

- **Células neurogliaformes** (*Neurogliaform cells*). Son células pequeñas, tipo botón, con muchas dendritas finas y radiales que son cortas, sin espinas, finamente rebordeadas y raramente ramificadas, formando un campo dendrítico esférico y altamente simétrico. El axón puede provenir de cualquier parte del soma o de la base de una dendrita. Poco después de su origen forma una densa arborización entrelazada de axones extremadamente finos. Los botones se distribuyen en los axones colaterales para formar sinapsis GABAérgicas sobre las dendritas de la célula diana (Markram y col., 2004).
- **Células Cajal-Retzius** (*Cajal Retzius cells*). Son células multipolares con procesos horizontales que aparecen únicamente en la capa I. Su soma puede tener diferentes morfologías según su localización cortical. Los axones están confinados a la capa I y poseen una trayectoria horizontal, por lo que no presentan axones de proyección (Fairén y col., 2002). De ellos parten fibrillas terminales que pueden ser ascendentes o descendentes que terminan en los penachos de las neuronas piramidales. En capa I también aparece un grupo de interneuronas heterogéneas multipolares pequeñas con plexos y arborizaciones diferentes. Sintetizan y secretan Reelina, una glucoproteína de matriz extracelular implicada en la migración radial y en la organización citoarquitectónica cortical.

1.7.4.2.2. Tipos de interneuronas según sus características moleculares (neuroquímicas)
(Tabla. 1.5)

Proteínas ligadoras de calcio

Las proteínas ligadoras de calcio (CaBP) calbindina, parvalbúmina y calretinina suelen ser expresadas por tres subpoblaciones diferentes de interneuronas (DeFelipe, 1993). Sin embargo, suele existir solapamiento entre calbindina y calretinina.

Tipo morfológico		Blanco sináptico	Contenido neuroquímico
Células en cesto (multipolares)	Grande	Soma y dendritas proximales	PV, CB, CCK, NPY (CR, SOM)
	Pequeña		PV, VIP
	Nido		PV
Células en candelabro (multipolares y bipenacheadas)		Cono axónico	PV (CB)
Células de Martinotti (bipenacheada)		Dendritas distales. También proximales y soma	SOM (CB, CR, NPY, CCK)
Células bipolares (bipenacheadas, bipolares)		Dendritas distales	CR, VIP
Células doble bouquet (bipenacheadas)		Dendritas distales	CB, CR (VIP, CCK, SOM)
Células bipenacheadas (bipolares, bipenacheadas)		Dendritas distales	CB, CR, NPY, VIP, SOM, CCK

Tabla. 1.5. Clasificación de las interneuronas de la corteza según sus características morfológicas, su blanco sináptico y su contenido neuroquímico. Las interneuronas corticales se pueden clasificar según la morfología del soma y la disposición de sus dendritas, la zona inervada en la neurona principal y la combinación del contenido neuroquímico en CaBP y/o neuropéptidos. Los marcadores moleculares que expresan con menor frecuencia se encuentran entre paréntesis.

- **Parvalbúmina.** La PV sólo aparece en subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas (Miettinen y col., 1997; Wouterlood y col., 2000). En ratón, la PV aparece en un 50%, aproximadamente, de las interneuronas (Wonders y Anderson, 2006). Se suele pensar que la PV es un marcador de las células en cesto, aunque sólo se expresa en la mitad de ellas (células en cesto grandes y nido) (Kawaguchi y Kubota, 1998; Wang y col., 2002) y, además, también es expresada por las células en candelabro (DeFelipe, 1989). La PV marca un grupo de interneuronas que no expresa CR, SOM, NPY, CCK, NOS ni ChaT (colín acetil transferasa). Un pequeño porcentaje de ellas coexpresa CB (Kubota y col., 1994; Kubota y Kawaguchi, 1994; Gonchar y col., 2008).
- **Calretinina.** Las neuronas inmunorreactivas para CR, generalmente, también expresan VIP, aunque existen algunas neuronas que sólo expresan CR o sólo expresan VIP (Kubota y col., 1994; Kubota y Kawaguchi, 1994). Las neuronas CR y/o VIP positivas pueden coexpresar CCK, aunque también existen neuronas CCK negativas para CR y VIP (Kawaguchi y Kondo, 2002). Las células CR-positivas no colocan con PV o NOS y sólo algunas lo hacen con CB (Kubota y col., 1994; Kubota y Kawaguchi, 1994). Suelen tener una morfología bipolar o multipolar (Miettinen y col., 1997) y constituyen alrededor de un 15% de las interneuronas GABAérgicas (Wonders y Anderson, 2006).

- *Calbindina*. CB suele ser coexpresada con muchos neuropéptidos y otras CaBP (Markram y col., 2004). Además, aparece tanto en interneuronas como en principales, por lo que no se usa como marcador de interneuronas.

Neuropéptidos

Los neuropéptidos empleados como marcadores de interneuronas son somatostatina, péptido intestinal vasoactivo, colecistoquinina y neuropéptido Y. Al igual que en el caso de las CaBP, un único neuropéptido no suele correlacionar con un único tipo anatómico o electrofisiológico de interneurona.

- *Somatostatina*. Las células que expresan SOM son las células de Martinotti (Wahle, 1993) y las células en cesto pequeñas y nido (Wang y col., 2002), constituyendo un 30%, aproximadamente, de las interneuronas GABAérgicas murinas (Wonders y Anderson, 2006). Las células de Martinotti siempre expresan SOM pero nunca expresan PV ni VIP (Markram y col., 2004). En general, las neuronas que expresan SOM no coexpresan PV y, generalmente, no suelen expresar CR (Kubota y col., 1994; Kubota y Kawaguchi, 1994), aunque se han identificado subgrupos de interneuronas SOM-CR positivas (Xu y col., 2006). La colocalización de SOM-CB y SOM-NPY es frecuente (Hendry y col., 1984a; Kubota y col., 1994; Kubota y Kawaguchi, 1994; Kawaguchi y Kubota, 1997; Gonchar y col., 2008). Las células SOM positivas también pueden expresar NOS (Kubota y col., 1994; Kubota y Kawaguchi, 1994).
- *Neuropéptido Y*. Las neuronas que expresan NPY, al igual que las SOM positivas, forman un denso plexo cortical tanto en las capas I y II como en capa VI en todas las áreas corticales (Hendry y col., 1984b). En la CE las células NPY-positivas aparecen principalmente en capas profundas (IV-VI) (Kohler y col., 1986).
- *Péptido intestinal vasoactivo*. Las células en cesto pequeñas, las células doble bouquet y las células bipolares siempre expresan VIP (Kawaguchi y Kubota, 1998; Wang y col., 2002; Markram y col., 2004).
- *Colecistoquinina*. La CCK es expresada por células en cesto grandes y células de Martinotti (Kawaguchi y Kubota, 1998). Las neuronas CCK GABAérgicas pueden contener VIP y/o CR (Kubota y Kawaguchi, 1997). En la corteza entorrinal de humanos, las neuronas CCK-positivas aparecen en las capas II, IV y VI (Lotstra y Vanderhaeghen, 1987).

Expresión combinada de proteínas ligadoras de calcio y neuropéptidos

Una interneurona puede coexpresar de 5 a 7 neuropéptidos y diferentes CaBP (Wang y col., 2002). PV, SOM y VIP suelen encontrarse en poblaciones diferentes de neuronas, aunque esta exclusión no es perfecta a nivel de ARNm.

En ratones adultos, se ha demostrado que más del 95% de la interneuronas GABAérgicas se marcan con uno o más de los siguientes marcadores: PV, CR, SOM, VIP, NPY, CCK, NOS y ChaT. Las neuronas que expresan PV son las interneuronas GABAérgicas más abundantes (40%), seguidas de las que expresan CR y SOM (<25% cada una). VIP, NPY y CCK constituyen menos del 10% cada una y las que expresan ChaT y

Introducción

NOS representan menos del 1% (Gonchar y Burkhalter, 2003; Gonchar y col., 2008) (Fig. 1.20).

La combinación de marcadores que se coexpresan en una misma interneurona son: SOM-NPY (Hendry y col., 1984a; Kawaguchi y Kubota, 1997; Gonchar y col., 2008), VIP-CCK (Kubota y Kawaguchi, 1997; Cauli y col., 2000), VIP-CR (Porter y col., 1998; Cauli y col., 2000), CR-CCK (Kubota y Kawaguchi, 1997), CR-SOM (Xu y col., 2006), SOM-VIP, CR-NPY, CR-VIP, CCK-NPY, CR-SOM-NPY (Gonchar y col., 2008), CR-SOM-VIP (Cauli y col., 2000; Gonchar y col., 2008). Las neuronas que expresan CR y SOM son un subtipo de células de Martinotti, cuya arborización dendrítica y propiedades de disparo son diferentes de las células de Martinotti que no contienen CR (Xu y col., 2006; Gonchar y col., 2008). Las neuronas que expresan CR, SOM y NPY son un subgrupo de células de Martinotti. Además, esta combinación no se da en ninguno de los tres tipos de células en cesto (Cauli y col., 2000; Wang y col., 2002; Markram y col., 2004; Gonchar y col., 2008). NPY y VIP son producidos por poblaciones distintas (Cauli y col., 2000; Kawaguchi y Kubota, 1997; Kubota y col., 1994; Kubota y Kawaguchi, 1994; Wang y col., 2004; Gonchar y col., 2008).

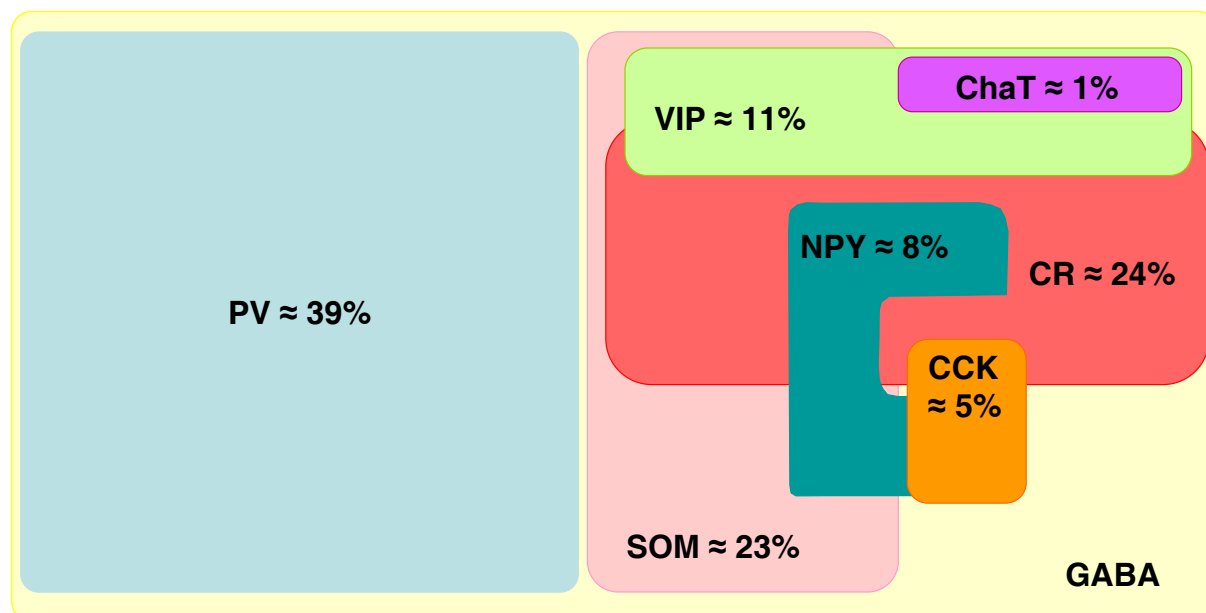


Figura 1.20. Expresión combinada de proteínas ligadoras de calcio y neuropéptidos en interneuronas GABAérgicas corticales en el ratón adulto. La figura muestra el porcentaje de interneuronas GABAérgicas que expresan cada marcador, así como la coexpresión de los distintos marcadores en subpoblaciones de interneuronas. Modificado de Gonchar y col., 2008.

Por lo tanto, y de acuerdo con los estudios realizados en la corteza visual (Gonchar y Burkhalter, 1997) y la corteza frontal de rata (Kubota y col., 1994; Kawaguchi y Kubota, 1997; Kawaguchi y Kondo, 2002), donde se confirma que las neuronas positivas para PV son poblaciones que no se solapan con SOM y VIP; la coexpresión de SOM y CR (Xu y col., 2006); que no todas las interneuronas que expresan VIP también coexpresan CR y los trabajos de Toledo-Rodriguez y col. (2005) y de Miyoshi y col. (2007), las interneuronas pueden marcarse, casi en su totalidad, ya que existen pequeñas diferencias según el área

cortical y la especie, empleando los marcadores PV, SOM, VIP y CR. Los marcadores CCK y CB no pueden emplearse para este fin porque ambos son también expresados por neuronas piramidales (Cauli y col., 2000).

1.7.4.3. Tipos neuronales de las capas de la corteza entorrinal (Canto y col., 2008)

Capa I

La mayoría de las células de la capa I son las células multipolares, además de existir células horizontales. En general, las células multipolares no poseen espinas o poseen muy pocas. Estas neuronas suelen ser GABAérgicas y positivas para CR. La gran mayoría de la interneuronas que expresan CR en las capas superficiales son GABAérgicas (Miettinen y col., 1997). Las dendritas se extienden por capa I y, a veces, llegan hasta la II (Miettinen y col., 1997; Wouterlood y col., 2000). Los axones de capa I llegan hasta las capas II y III, donde inhiben a las neuronas principales. Una pequeña proporción de las interneuronas CR-positivas pueden ser glutamatérgicas o contener CB o NPY (Wouterlood y Pothuizen, 2000). Las células horizontales se localizan en la zona de transición entre las capas I y II. Tienen un soma de esférico a elongado. Los axones viajan hacia el hipocampo atravesando las capas profundas. Estas neuronas horizontales son GABAérgicas y en la CE lateral son positivas para VIP, mientras que en la CE medial coexpresan CCK (Kohler y col., 1986; Canto y col., 2008).

Capa II

La capa II está formada, mayoritariamente, por densos paquetes de células piramidales medianas y grandes y por células estrelladas de tipo principal. Las más abundantes en la CE medial son las células estrelladas (Klink y Alonso, 1997). Poseen un soma variable, aunque la característica que las define es la presencia de un árbol dendrítico con espinas. Además, presentan múltiples dendritas que se ramifican ampliamente. Tras alcanzar la superficie pial, las dendritas se curvan y corren paralelas a ella. La extensión de las dendritas basales es menor. Sus axones son finos y forman colaterales que se ramifican repetidamente, alcanzando las capas superficiales y formando una red (Klink y Alonso, 1997). El axón también puede mandar colaterales a las capas III-VI, y en el haz angular las colaterales viajan hacia el subículo y hacen diana en el giro dentado y CA3 (Tamamaki y Nojyo, 1993). La mayoría de las células estrelladas son excitadoras positivas para glutamato y CB (Canto y col., 2008). En la CE lateral, las células estrelladas son menos abundantes y son reemplazadas por las células *fan* (Tahvildari y Alonso, 2005). Poseen un cuerpo poligonal con dendritas primarias finas y con pocas espinas que salen del soma en dirección ascendente y horizontal, por lo que tienen una morfología similar a las células estrelladas. La diferencia es que las células *fan* sólo poseen pequeñas dendritas descendentes. Los axones son descendentes y pueden tener colaterales ascendentes muy finos que alcancen las capas II y III (Tahvildari y Alonso, 2005).

Además, en la capa II aparecen células piramidales de soma piramidal u ovoide de tamaño mediano, que poseen una elongación perpendicular a la superficie pial (Alonso y

Klink, 1993). La mayoría de estas células poseen una dendrita apical densamente espinada que se ramifica en el borde de la capa I. Las dendritas basales de todos los tipos de células piramidales son espinadas, finas, cortas y estrechas, con muchas ramificaciones en la capa III. Los axones de las células piramidales son lisos y finos y algunos siguen una ruta sinusoide en las capas II y III, formando colaterales que se distribuyen por las capas I-III, que son menos profusas que las colaterales de las células estrelladas (Klink y Alonso, 1997). También existen otros tipos de células de tipo piramidal, denominadas neuronas piramidales horizontales, que poseen un soma orientado de forma oblicua (Tamamaki y Nojyo, 1993). Otra célula piramidal descrita en la CE lateral posee dendritas apicales muy abundantes y con escasas espinas o sin ellas, que se ramifican en la capa II. El delgado penacho de dendritas apicales alcanza la capa I. Las neuronas tienen dendritas basales finas y escasamente espinadas y su axón posee colaterales que se extienden por las capas I-III con muchas varicosidades. El axón principal llega hasta capa III, aunque no siempre hasta el haz angular (Tamamaki y Nojyo, 1993).

Las interneuronas de capa II son neuronas multipolares, bipolares, células en cesto y en candelabro. Las células multipolares poseen cuerpos fusiformes, poligonales o redondos, con dendritas que se extienden en todas las direcciones, alcanzando la capa I y III. Los axones de las células multipolares viajan hacia la sustancia blanca, pero también forman sinapsis dentro de capa II (Tamamaki y Nojyo, 1993). Morfológicamente se parecen a las células estrelladas de la CE medial, pero son electrofisiológicamente distintas. Las células multipolares contienen VIP, sustancia P, CCK, SOM y/o GABA y en la CE lateral también NPY (Kohler y col., 1986; Canto y col., 2008). Las células bipolares horizontales poseen escasas espinas y son consideradas como neuronas locales (Schwartz y Coleman, 1981). El soma, con forma de huso, está entre en la capa II y la I. Las dendritas están orientadas horizontalmente en el borde entre las capas I y II. Las células bipolares están orientadas verticalmente y poseen una dendrita primaria lisa y fina ascendente y otra descendente que se ramifica en dendritas más finas distalmente (Wouterlood y col., 2000). Las células bipolares expresan CR y VIP. En la CE lateral pueden expresar también CCK y NPY (Kohler y col., 1986; Klink y Alonso, 1997).

Las células en cesto poseen un cuerpo esférico y pequeño y dendritas con escasas espinas que suelen ramificarse en la capa I. El árbol axonal está confinado a la capa II. Forman sinapsis inhibitorias simétricas alrededor del soma de células estrelladas o piramidales. Las células en cesto son GABAérgicas y pueden contener CCK, además de expresar PV (Kohler y col., 1986).

Las células en candelabro o axo-axónicas poseen agregaciones verticales de botones axonales, denominados *velas*, que están localizadas en la parte superior del soma, el cual puede tener diversas morfologías. Las dendritas apenas poseen espinas, están pobremente ramificadas y se originan del polo basal y apical del soma, por lo que presentan una arborización bipenacheada o bipolar que se localiza en capas II-III. Las células en candelabro verticales sólo aparecen en la CE medial. Las células en candelabro se organizan horizontalmente tanto en la CE lateral como medial y su plexo axonal es más pequeño que el de las células orientadas verticalmente. Las células en candelabro son

GABAérgicas, a menudo PV-positivas y forman contactos simétricos con el segmento inicial del axón de las células principales (Soriano y col., 1993).

Capa III

La capa III de la CE lateral y medial posee neuronas piramidales similares (Tahvildari y Alonso, 2005), sin embargo, en la CE medial existen células piramidales espinadas y no espinadas, mientras que en la CE lateral existen células piramidales con espinas muy escasas. El soma de las neuronas piramidales espinosas, que está localizado en la capa III, emite una dendrita apical muy prominente que se bifurca y se ramifica profusamente. Las dendritas basales espinosas se expanden más en dirección horizontal que vertical, permitiendo una conectividad local. El axón principal proyecta hacia el subículo a través del haz angular. Algunos axones colaterales aparecen en capas II-IV (Gloveli y col., 1997).

Las células piramidales no espinosas tienen un soma esférico o triangular de diferentes tamaños. La dendrita apical sin espinas se ramifica muy cerca del soma y en las capas superficiales, alcanzando la pía. Las dendritas verticales se expanden de forma similar a las de las neuronas espinadas, mientras que las dendritas horizontales, sobre todo las basales, se extienden menos. Poseen un árbol dendrítico basal más circular y su axón viaja hacia el haz angular. Las colaterales parten del axón cerca del soma y pueden permanecer en la misma capa celular o distribuirse por todas las capas de la CE (Gloveli y col., 1997; Canto y col., 2008).

La capa III también contiene células estrelladas, cuyo soma es elongado, poligonal o esférico. A veces, poseen espinas dendríticas alrededor del soma, mientras que otras tienen una o dos dendritas basales espinosas y dendritas ascendentes que se ramifican en la capa I. Los axones alcanzan la sustancia blanca y sus colaterales de capa III forman la lámina disecans (Germroth y col., 1989). En capa III también aparecen somas de células multipolares, que son esféricas y pequeños, con dendritas que se extienden lateralmente. La mayoría aparece en la CE lateral y están ampliamente separadas unas de otras. Poseen múltiples dendritas escasamente espinadas que se extienden por todas las direcciones con una ramificación moderada. Las dendritas más densas se dirigen hacia las capas superficiales, mientras que las más finas radian lateralmente hacia las capas profundas. Los axones alcanzan el hipocampo a través de la sustancia blanca. Las colaterales se distribuyen por los alrededores del soma de la célula multipolar (Germroth y col., 1989; Canto y col., 2008).

Las neuronas multipolares de circuito local se encuentran, principalmente, en la CE medial. Se caracterizan por dendritas apicales que pueden ser muy anchas y que alcanzan la superficie cortical. Además, poseen múltiples dendritas basales compactas y una prominente arborización axonal. El axón alcanza las capas I-III, pero raramente alcanza la lámina disecans (Gloveli y col., 1997). Las neuronas multipolares contienen GABA, CCK, SOM, sustancia P y raras veces VIP (Kohler y Chan Palay, 1983; Kohler y col., 1985; Wouterlood y Pothuizen, 2000). Otro grupo de neuronas multipolares inhibitoras poseen dendritas con pocas espinas que se extienden hasta las capas profundas en lugar de las

Introducción

superficiales. Además, poseen un axón que se extiende localmente, con colaterales que alcanzan la capa I.

Las interneuronas con aspecto similar a las neuronas piramidales poseen un soma triangular y dendritas basales y apicales sin espinas, que se ramifican formando una densa red local en las capas superficiales con una apariencia circular. Las dendritas apicales, a menudo, no alcanzan la superficie pial y tienen extensiones dendríticas apicales y horizontales. Las dendritas basales se extienden horizontalmente, al igual que las apicales. Además, poseen un plexo axonal denso en los alrededores del soma y se extiende superficialmente en la capa II (Gloveli y col., 1997).

Las células bipolares aparecen en las dos áreas de la CE. Poseen un soma en forma de huso, con una dendrita ascendente y otra descendente sin espinas y delgadas, que pueden llegar a ser largas. Las colaterales ascendentes alcanzan la capa I, atravesando la II. El axón parte de la dendrita primaria descendente y se extiende por capa III y IV. Una parte de las neuronas bipolares contienen VIP o CR. Las que contienen CR son más abundantes en la CE lateral que medial (Miettinen y col., 1997; Wouterlood y col., 2000).

Capa IV

Ocasionalmente, aparecen en la lámina disecans neuronas con morfología piramidal, en los bordes con las capas III y V, que poseen una morfología y fisiología similar a las neuronas de capa III y V, respectivamente (Canto y col., 2008).

Existen células bipolares, cuyas dendritas crecen horizontalmente en lugar de verticalmente hacia la superficie pial. En la capa IV aparecen los axones colaterales que viajan hacia la capa III y las capas profundas (Canto y col., 2008). Las células bipolares pueden contener VIP y CCK (Kohler y col., 1986).

Capa V

No existen diferencias entre las neuronas principales de la CE lateral y medial (Hamam y col., 2000; Hamam y col., 2002). Las dendritas apicales y los axones colaterales suelen viajar hacia las capas superficiales y, a veces, alcanzan la superficie pial. El árbol dendrítico basal se extiende, principalmente, por las capas profundas. El axón principal viaja hacia el haz angular y el subículo (Hamam y col., 2000; Hamam y col., 2002). En general, la mayoría de las células de la capa V son células piramidales grandes que se localiza inmediatamente bajo la capa IV, mientras que las células que se localizan más profundamente en la capa V son células pequeñas. El soma de las neuronas piramidales grandes posee múltiples formas. El soma de tipo piramidal es el más frecuente, pero también se pueden observar somas con forma estrellada. Todas las células piramidales grandes poseen una dendrita apical espinosa y grande que, normalmente, se ramifica cerca del soma. La dendrita apical alcanza la superficie pial tras ramificarse en las capas I y II en un penacho. Las espinas aparecen en las dendritas tras la primera o segunda bifurcación (Lingenhohl y Finch, 1991). Las dendritas basales son más finas en comparación con las dendritas apicales y se extienden profusamente en todas las direcciones en las capas V y VI (Gloveli y col., 2001). Las neuronas pequeñas, en comparación con las neuronas principales

grandes, poseen más dendritas basales y una mayor densidad de espinas, extendiéndose por las capas profundas. El axón principal se dirige hacia el haz angular y alcanza, eventualmente, el giro dentado a través del subículo (Gloveli y col., 2001). Las colaterales de estos axones se dividen en la capa V, formando colaterales que viajan hacia la capa IV, alcanzando los somas vecinos (Hamam y col., 2000; Hamam y col., 2002). Algunas colaterales también se dirigen hacia las capas superficiales (Canto y col., 2008).

Un segundo tipo de célula principal en capa V son las células horizontales (Lingenhohl y Finch, 1991; Hamam y col., 2000; Hamam y col., 2002). Su soma es más poligonal que piramidal. Poseen una dendrita apical con escasas espinas que se extiende hacia la superficie pial, ramificándose mucho desde la capa IV a la I. En la CE medial, a diferencia de la lateral, la dendrita apical primaria no es tan delgada como las otras dendritas, pero está espinada. El plexo dendrítico basal es espinado y pequeño y se extiende horizontalmente por las capas V y VI. El axón de las células horizontales se ramifica en las capas V y VI y se dirige hacia el haz angular (Hamam y col., 2000; Hamam y col., 2002; Canto y col., 2008).

Un tercer tipo neuronal son las células multipolares polimórficas (Hamam y col., 2000; Gloveli y col., 2001; Hamam y col., 2002). El soma es esférico o un poco piramidal. En lugar de tener una prominente dendrita apical, estas neuronas tienen una arborización dendrítica multipolar con espinas que se extiende en todas las direcciones, cubriendo largas distancias y llegan, incluso, al subículo (Hamam y col., 2000; Gloveli y col., 2001; Hamam y col., 2002; Canto y col., 2008). Los axones se ramifican en la capa V y alcanzan al haz angular, llegando hasta el subículo y alcanzando el giro dentado (Gloveli y col., 2001). Estas neuronas pueden expresar PV, SOM, NPY y sustancia-P (Kohler y Chan Palay, 1983; Kohler y col., 1986).

Las células fusiformes que proyectan hacia el hipocampo se encuentran en la zona más superficial de la capa V. Poseen un único árbol dendrítico ascendente que, en ocasiones, alcanza la pía y un árbol dendrítico descendente. El axón se extiende localmente, aunque el axón principal proyecta hacia el hipocampo. Las neuronas fusiformes contienen CR (Lingenhohl y Finch, 1991; Wouterlood y col., 2000). En la zona más superficial de la capa V, aparecen células bipolares con un soma en forma de huso (Lingenhohl y Finch, 1991; Wouterlood y col., 2000). Las dendritas se originan de los polos basales y apicales. Exceptuando la zona cercana al soma, las dendritas son espinadas y se extienden hasta el subículo, en una dirección, y hasta la capa I, en la otra (Lingenhohl y Finch, 1991). Sin embargo, la mayoría de las dendritas se encuentran en las capas profundas. El axón principal viaja hacia las capas profundas, perfora el subículo y alcanza el giro dentado (Gloveli y col., 2001). Las células globulares tienen dendritas que aparecen radialmente desde el soma, con muchas espinas y están densamente ramificadas. Estas dendritas se ramifican en las capas III-V. El axón se dirige a la capa V y el haz angular (Lingenhohl y Finch, 1991; Canto y col., 2008). Las células multipolares pueden contener SOM, sustancia-P, NPY y GABA (Kohler y col., 1986).

Capa VI

La capa VI se considera multilaminada y bordea la sustancia blanca. Las neuronas multipolares se localizan por toda la capa VI. Poseen somas pequeños y las dendritas espinadas se extienden principalmente por la capa VI, de forma paralela a la laminación. Las dendritas también se dirigen hacia el haz angular y, en ocasiones, hacia la capa III (Lingenhohl y Finch, 1991). Existen células multipolares con dendritas basales y sin dendrita apical que envuelven al soma en todas las direcciones. Los axones y las colaterales alcanzan el subículo, mientras que existen otras colaterales que, a veces, alcanzan las capas superficiales (Canto y col., 2008).

En la CE medial, el soma de las neuronas piramidales clásicas tiene un tamaño mediano. La diferencia de las células piramidales en comparación con las capas III y V es que la dendrita principal no siempre viaja radialmente hacia las capas superficiales, ya que también lo hacen horizontalmente hacia las capas V y VI o descienden hacia el haz angular y el subículo (Canto y col., 2008). Las dendritas basales y las colaterales se extienden por las capas V y VI. Los axones de las células piramidales viajan tanto al haz angular y el subículo como hacia las capas superficiales. Los axones colaterales están localizados en las capas V y VI, el haz angular y el subículo (Canto y col., 2008).

En resumen, existen diferencias entre los tipos celulares y su distribución en la CE lateral y medial. Las diferencias son más notables en las capas I y II que en las capas III y V, ya que, por ejemplo, existen muchas diferencias en cuanto a la distribución de las neuronas multipolares en la capa I, al igual que ocurre con las neuronas en candelabro y en cesto de la capa II. Además, existen muchas diferencias en la distribución de las células que contienen PV y CR, por lo que el contenido de interneuronas difiere mucho entre la CE lateral y medial. Incluso, las neuronas principales de la capa II, aunque no se diferencian mucho en su morfología, sí se diferencian en su electrofisiología. Por lo tanto, los microcircuitos de las capas I y II de la CE lateral y medial son diferentes (Canto y col., 2008).

1.7.5. Corteza entorrinal y memoria. Implicación en la enfermedad de Alzheimer

La memoria se clasifica en dos sistemas cualitativamente diferentes de almacenamiento de la información, denominados memoria declarativa o explícita (información que puede expresarse a través del lenguaje, como la memoria episódica o la semántica) y memoria no declarativa, implícita o de procedimientos (habilidades motoras adquiridas y asociaciones). La memoria también puede clasificarse según su permanencia temporal, diferenciándose así la memoria a corto plazo o inmediata (fracciones de segundos o segundos), la memoria de trabajo (segundos o minutos) y la memoria a largo plazo (días o años, a través de la consolidación).

El hipocampo, junto con las estructuras corticales del giro parahipocampal, está implicado en la memoria declarativa, aunque no en los procesos de memoria de trabajo ni en muchos procesos de la memoria no declarativa a largo plazo. La CE tiene un papel muy importante en el flujo de la información a través de la formación hipocampal. No es simplemente la principal entrada de la información sensorial que posteriormente se

procesará en la formación hipocampal, sino que, además, devuelve esta información procesada hacia las distintas áreas neocorticales. La CE constituye el principio y el final del bucle de procesamiento de información que se produce en la formación hipocampal (Andersen y col., 2007).

La región parahipocampal, específicamente, está implicada en funciones de memoria de reconocimiento de objetos, representación sensorial y orientación espacial. Las interconexiones de las cortezas perirrinal y entorrinal con la formación hipocampal y la neocorteza controlan y regulan la transferencia recíproca de información entre la neocorteza y el hipocampo (De Curtis y Pare, 2004). Las estructuras del lóbulo temporal medial, entre las que se encuentran el giro dentado, hipocampo, subículo, presubículo, parasubículo y las cortezas entorrinal, perirrinal y postririnal, son necesarias para el establecimiento de la memoria declarativa a largo plazo. Están implicadas en la consolidación de la información procedente de las cortezas de asociación. Además, la corteza entorrinal, perirrinal y postririnal son importantes para la integración de la información polimodal y polisensorial antes de que ésta llegue al hipocampo. El hipocampo recibe sólo un pequeño número de conexiones directas desde las áreas neocorticales, siendo la CE una zona de convergencia de las proyecciones de la neocorteza, en donde la información se recibe y procesa, seleccionando las entradas más relevantes y se envía, posteriormente, a todas las áreas del hipocampo (Lavenex y Amaral, 2000; Koganezawa y col., 2008). La CE, junto con el hipocampo, procesa la información contextual. En la sincronización están implicadas la corteza perirrinal y la prefrontal, mientras que el tono del estímulo se procesa a través del tálamo. Además, cada una de las áreas de la CE está implicada en una función ligeramente diferente, ya que la CE lateral está relacionada con la memoria de la señal, mientras que la CE medial está más implicada en el contexto de la memoria (Hebert y Dash, 2004). Por otro lado, la CE lateral procesa los objetos nuevos, mientras que la CE medial interviene en la mejora espacial de los objetos previamente procesados (Pitkanen y col., 2000).

El grupo de Hyman y col., en 1984, publicó un estudio en el que mostraban que la lesión de la corteza entorrinal en el Alzheimer (capas II y V) provocaba el aislamiento del hipocampo del resto de la corteza cerebral por destrucción de las aferencias que forman la vía perforante hacia el hipocampo. Este estudio concluye que esta desconexión del hipocampo provoca los trastornos de memoria característicos del Alzheimer. Esto es debido a que la información de la corteza no alcanza directamente al hipocampo, sino que ésta termina en la CE, desde donde es transmitida al hipocampo, por lo que es un centro de convergencia de la información sensorial procedente de la corteza. Del mismo modo, la información procedente del hipocampo se dirige a la CE y, de aquí, a las distintas áreas corticales y subcorticales. Por lo tanto, el eje neocortico-entorrino-hipocampal es necesario para la función de la memoria (Sobreviela y col., 1997).

Existen muchas evidencias de cambios en la CE asociados al envejecimiento y, principalmente, al Alzheimer. Los depósitos extracelulares de A β y la formación de ovillos neurofibrilares aparecen en la CE en los estadios más tempranos del Alzheimer (Hirano y Zimmerman, 1962; Braak y Braak, 1985; Hansen y col., 1991; Price y col., 1991; Senut y col., 1991; Van Hoesen y col., 1991; Braak y Braak, 1992; Hof y col., 1992; Vermersch y

Introducción

col., 1992; Benzing y col., 1993; Bouras y col., 1994), siendo las neuronas de capa II y V las que se ven más frecuentemente afectadas por el proceso neurodegenerativo (40-60%) (Hyman y col., 1984; Lippa y col., 1992; Vermersch y col., 1992; Gomez Isla y col., 1996; Sobreviela y col., 1997; Kumar y Buckmaster, 2006), el volumen de la CE se reduce por la existencia de atrofia (Mizutani y Kasahara, 1997; Juottonen y col., 1998 y 1999; De Toledo Morrell y col., 2000; Du y col., 2003; De Toledo Morrell y col., 2004; Teipel y col., 2006; Devanand y col., 2007; Stoub y col., 2008; Zhan y col., 2009) y se han encontrado fallos en la CE a nivel sináptico (Lippa y col., 1992; Wakabayashi y col., 1994; Kumar y Buckmaster, 2006), lo que provoca un fallo cognitivo que afecta al proceso de memoria (Schwarcz y Witter, 2002; Pennanen y col., 2004), que es uno de los síntomas clínicos más conocidos de la EA, existiendo una relación directa entre el volumen del hipocampo y la CE con la función de memoria (De Toledo Morrell y col., 2000 y 2004; Stoub y col., 2008).

1.8. Planteamiento del trabajo y Objetivos

Actualmente, no existe ningún tratamiento efectivo contra el Alzheimer. Esta enfermedad neurodegenerativa progresa de forma continua e irreversible, llevando al individuo a un deterioro cognitivo severo y finalmente a la muerte. Aunque las lesiones neuropatológicas típicas de esta enfermedad se describieron hace más de 100 años, el diagnóstico definitivo se realiza todavía hoy en día principalmente en material postmortem. En particular, el diagnóstico clínico es muy complicado en las fases tempranas de esta enfermedad, pero es de gran importancia, ya que las terapias actuales y futuras deberían tener su mayor eficacia en los primeros estadios de la enfermedad. Un tratamiento efectivo debería frenar o, al menos, retrasar el proceso neurodegenerativo antes de la aparición de deficiencias cognitivas graves. Uno de los mayores retos biomédicos actuales para el tratamiento y cura del Alzheimer es el desarrollo y caracterización de buenos modelos animales con el fin de buscar biomarcadores que ayuden a la identificación de las fases tempranas y su diagnóstico, así como para el desarrollo de tratamientos terapéuticos eficaces.

La mayoría de los ratones transgénicos generados hasta la fecha, y que poseen el gen humano mutado de la APP (APP, PS1xAPP, APPxTau y PS1xAPPxTau), desarrollan placas amiloides y neuritis distróficas de forma similar a las observadas en pacientes de Alzheimer. Aquellos modelos que además sobre-expresan Tau (APPxTau y PS1xAPPxTau) desarrollan también ovillos neurofibrilares. Muchos de estos modelos presentan deficiencias cognitivas y conductuales. Sin embargo, ningún modelo reproduce actualmente todos los aspectos neuropatológicos típicos del Alzheimer. En este sentido, uno de los aspectos más relevantes que está ausente en la mayoría de los modelos es la muerte neuronal. Nuestro grupo de investigación lleva desde el año 2003 caracterizando a nivel celular y molecular el modelo doble transgénico PS1_{M146L}xAPP_{751SL}, caracterizado por el desarrollo de depósitos amiloides desde los 3-4 meses en regiones severamente afectadas en la EA, como son el hipocampo y la corteza cerebral (Blanchard y col., 2003; Schmitz y col., 2004; Caballero y col., 2007). En particular, nuestro grupo, y en estrecha colaboración con el grupo del Dr. Vitorica de la Universidad de Sevilla, ha analizado con detalle la progresión de los daños neuropatológicos y muerte neuronal en el hipocampo de este modelo (Ramos y col., 2006; Caballero y col., 2007; Baglietto-Vargas, 2008; Jimenez y col., 2008). En esta región, a edades tempranas (6 meses), sólo existe muerte selectiva de la población de interneuronas GABAérgicas SOM/NPY (60%), mientras que las neuronas piramidales no se ven afectadas, a pesar de la existencia de numerosos depósitos de amiloide. En realidad, la muerte de las neuronas piramidales (33%) no acontece hasta los 17 meses de edad, lo que indica la existencia de mecanismos de neuroprotección activados en las fases tempranas de la enfermedad.

Según la hipótesis inflamatoria de la enfermedad de Alzheimer, la activación de la microglía, en respuesta a la deposición de A β podría mediar la degeneración neuronal mediante la liberación de factores citotóxicos, tales como citoquinas pro-inflamatorias (TNF α ,

FASL, TRAIL, IL1 β , IL6, entre otras), aminoácidos excitadores, especies reactivas de oxígeno (NO, superóxido) u otros factores (Craft y col., 2006; Mrak y Griffin, 2005; Ranaivo y col., 2006; Zipp y Aktas, 2006). Sin embargo, también es posible que la activación glial (astroglía y microglía) pueda desencadenar una respuesta beneficiosa, pro- supervivencia y regeneración neuronal, liberando citoquinas anti-inflamatorias, factores de crecimiento neuronal, fagocitando y/o degradando A β extracelular, etc. (Streit, 2005; Butovsky y col., 2006). En este sentido, recientemente nuestro grupo ha descrito el papel de la respuesta neuroinflamatoria en los procesos de neuroprotección/neurodegeneración en el hipocampo de este modelo (Jimenez y col., 2008). La deposición de A β produce una rápida activación glial (microglía y astroglía). Sin embargo, el papel que juegan las células microgliales y astrogiales en la patología de la EA no está claramente definido. En el hipocampo de nuestro modelo PS1xAPP, la respuesta inflamatoria inicialmente ejerce un papel neuroprotector a través del fenotipo microglial alternativo, responsable de la fagocitosis de A β y la producción factores neurotróficos (IGF1), lo que explica la escasa muerte neuronal durante las primeras fases de la patología. Sin embargo, el aumento con la edad de los niveles de A β oligomérico soluble extracelular induce un proceso inflamatorio de carácter perjudicial en los animales de 18 meses, caracterizado por la producción de factores neurotóxicos (TNF α y NO por parte de la microglía y la astroglía, respectivamente), que podría ser responsable de la neurodegeneración de células principales hipocampales. Por lo tanto, la neuroinflamación puede desempeñar un papel clave en el desarrollo/progresión de la patología del Alzheimer, retrasando y/o incrementando la misma, en función del estado de diferenciación microglial. El estudio de la respuesta inflamatoria y la posible modulación del fenotipo microglial podría abrir nuevas vías para el desarrollo de estrategias terapéuticas neuroprotectoras.

En resumen, uno de los principales intereses de nuestro grupo de investigación es identificar dianas moleculares que permitan el desarrollo futuro de nuevos fármacos eficaces que modifiquen (retrasen y/o frenen) el proceso patológico de la EA. Por supuesto, para realizar esta tarea es necesario, en primer lugar, conocer los eventos celulares y moleculares implicados en el desarrollo de la patología. Por ello, y teniendo en cuenta los antecedentes anteriormente expuestos, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral es profundizar en la caracterización neuropatológica de este modelo PS1xAPP de EA, centrándonos en el proceso neurodegenerativo que tiene lugar en la corteza entorrinal, región severamente afectada, junto al hipocampo, desde las fases iniciales de la enfermedad. Para este estudio proponemos los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1. Determinar la vulnerabilidad de diferentes poblaciones neuronales de la corteza entorrinal a edades tempranas en el modelo PS1xAPP. Se analizarán las principales poblaciones de interneuronas GABAérgicas (SOM, NPY, PV y CR) y las neuronas principales glutamatérgicas. Para ello, se emplearán técnicas inmunohistoquímicas y estudios cuantitativos de recuento celular mediante estereología.

- Objetivo 2.** Analizar la expresión espacio-temporal del A β en la corteza entorrinal del modelo PS1xAPP y su implicación en el proceso neurodegenerativo. Para ello, se estudiará la expresión extracelular e intracelular del A β y sus diferentes formas (A β 1-40, A β 1-42, A β oligomérico y A β fibrilar). En este objetivo se utilizarán técnicas inmunohistoquímicas y tinciones específicas para el A β fibrilar junto con estudios cuantitativos mediante análisis de imagen.
- Objetivo 3.** Analizar el proceso neuroinflamatorio asociado al A β en la corteza entorrinal del modelo PS1xAPP y su posible implicación en la supervivencia y/o muerte neuronal. Para ello, se determinará la progresión de la activación microglial en relación a los depósitos de A β y la caracterización fenotípica (fenotipo beneficioso/perjudicial) de estas células. Para este objetivo se emplearán técnicas inmunohistoquímicas y técnicas moleculares (RT-PCR en muestras microdisecionadas por láser).
- Objetivo 4.** Analizar el posible efecto neuroprotector del litio en la corteza entorrinal del modelo PS1xAPP. Para ello, se estudiará la vulnerabilidad/supervivencia neuronal (recuento estereológico de diversas poblaciones neuronales) en un grupo experimental de animales PS1xAPP tratados crónicamente con carbonato de litio en la dieta en comparación con grupos controles (PS1 con dieta suplementada en litio y PS1xAPP con dieta estándar).

2. Materiales y Métodos

2.1. Animales de experimentación

2.1.1. Genotipos

En el presente trabajo se han empleado ratones macho pertenecientes a tres genotipos distintos:

- Ratones simples transgénicos PS1, con fondo genético C57BL/6, que sobre-expresan la forma humana mutada de la presenilina 1 (PS1_{M146L}) del Alzheimer familiar bajo el control del promotor HMGCoA-reductasa.
- Ratones doble transgénicos PS1xAPP con fondo genético C57BL/6 que se obtuvieron por cruce de los ratones transgénicos PS1M146L homocigotos con ratones con la doble mutación “Swedish” y “London” del Alzheimer familiar en el gen de la proteína precursora amiloide (APP_{751SL}, ver Fig. 2.1) bajo el promotor Thy1. Ambos tipos de ratones transgénicos pertenecen a la generación filial F6-F10 de los ratones transgénicos heterocigotos.
- Ratones no transgénicos “wild type” WT con fondo genético C57BL/6 se usaron como controles.

La generación y caracterización inicial de los ratones transgénicos PS1_{M146L} y PS1_{M146L}xAPP_{751SL} ha sido previamente descrita (Blanchard y col., 2003).



Figura 2.1. Esquema de las mutaciones que contiene la secuencia proteica de la proteína APP751 humana en el animal doble transgénico PS1xAPP. En el esquema se muestra la secuencia aminoacídica de la proteína APP, indicando la doble mutación que presentan los animales PS1xAPP. Se trata de las mutaciones *Swedish* (mutación que afecta a los aminoácidos 670 y 671) y *London* (en el aminoácido 717). La secuencia en gris son los aminoácidos que forman la proteína β-amiloide tras su procesamiento, la cual no se ve afectada directamente por las mutaciones. La zona verde es la fracción de membrana y las flechas indican las zonas de corte de las enzimas implicadas en el procesamiento.

2.1.2. Edad, número, procedencia y mantenimiento

Se han utilizado ratones macho PS1xAPP, PS1 y WT pertenecientes a los grupos de edades 2, 4, 6, 12 y 18 meses de edad. El número de animales empleados de cada genotipo

y edad en cada procedimiento experimental realizado en este trabajo se relacionan en la tabla 2.1.

Estudio experimental	2 meses	4 meses	6 meses	12 meses	18 meses	Genotipo
Interneuronas (IHQ)	6	6	6	6	6	WT
	6	6	6	6	6	PS1
	6	6	6	6	6	PS1xAPP
Neuronas principales (IHQ)	5		5			WT
	5		5			PS1
	5		5			PS1xAPP
Formas amiloides (IHQ, TS, RC)	10	10	10	10	10	PS1xAPP
Inflamación (IHQ)	6	6	6	6	6	WT
	6	6	6	6	6	PS1
	6	6	6	6	6	PS1xAPP
Autorradiografía	6		6			WT
	6		6			PS1
	6		6			PS1xAPP
Microdissección láser. RT-PCR		4	4			WT
		4	4			PS1
		4	4			PS1xAPP
Tratamiento con Litio (9 meses)			6			PS1mant
			6			PS1xAPPmant
			6			PS1xAPPLi
Total animales	79	58	109	46	46	338

Tabla 2.1. Relación del número de animales WT, PS1 y PS1xAPP empleados en el presente estudio de la corteza entorrinal lateral. En la tabla se muestra el tipo de estudio experimental y el número de animales empleados en cada estudio por edades y genotipo. IHQ: inmunohistoquímica; TS: Tioflavina-S, RC: rojo congo.

Todos los animales fueron suministrados por la industria farmacéutica Sanofi-Aventis (París, Francia), a través de Charles-River Laboratories (Francia), bajo un contrato de investigación entre esta industria y nuestro grupo de investigación. Los animales se mantuvieron en el estabulario de los Servicios Centrales de Investigación de la Universidad de Málaga bajo condiciones de temperatura media controlada de 21 ± 1 °C y un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 de oscuridad. Durante el tiempo de permanencia en el estabulario los animales tuvieron libre acceso al agua y al alimento estándar.

2.1.3. Animales con dieta suplementada con litio

Para el estudio del tratamiento con litio se emplearon animales transgénicos PS1 y PS1xAPP. A estos animales se les administró una dieta de libre acceso con un contenido de 1,2 g de carbonato de litio por kg de producto (Harlan Laboratories). Además, se aportó un suplemento de cloruro sódico (150 mM) en la bebida habitual de los animales de libre acceso. La ingesta de esta dieta con litio se prolongó durante 180 días, desde los 3 hasta los 9 meses de edad del animal. Para determinar los niveles de litio asimilado por los

animales, se analizó su concentración en plasma a los 71 y 150 días tras el inicio del tratamiento en los transgénicos PS1. Los niveles fueron de $0,34 \pm 0,03$ mM y $0,35 \pm 0,05$ mM, respectivamente.

Se utilizaron 6 animales por genotipo y grupo (PS1mant, PS1xAPPMant y PS1xAPPLi). Como controles se emplearon animales transgénicos PS1 y PS1xAPP de las mismas edades y que fueron alimentados con una dieta estándar o de mantenimiento.

Estos animales, suministrados también por Sanofi-Aventis, se mantuvieron en el estabulario de la Universidad de Sevilla durante todo el periodo de tratamiento en las mismas condiciones de temperatura y fotoperiodo que se han comentado anteriormente. El tratamiento experimental con litio de estos animales fue realizado por el grupo del Dr. Vitorica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla.

2.1.4. Legislación

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la Directiva Comunitaria del 24 de noviembre de 1986 (86/609/EEC) y el posterior Real Decreto RD 1201/2005 del 10 de octubre de 2005 para el mantenimiento y uso de animales de laboratorio y fueron aprobados por el 'Comité de Uso de Animales para la Investigación' de la Universidad de Málaga. El número de animales utilizados, así como el estrés y sufrimiento de éstos durante la manipulación y experimentación fueron reducidos al máximo.

2.1.5. Delimitación de la corteza entorrinal

La delimitación de la corteza entorrinal se realizó en relación a las estructuras corticales adyacentes a ésta. La CE ocupa la región ventro-caudal de ambos hemisferios cerebrales, tiene forma de cápsula y está rodeada por varias áreas corticales. Anteriormente, contacta con la corteza amigdaloides y olfativa, como la piriforme. Lateral y medialmente, está bordeada por la corteza peri-amigdaloides y el núcleo cortical posterior de la amígdala. En la zona medial, se mezcla con estructuras que pertenecen a la formación hipocámpal o parahipocámpal, como son la transición amígdalo-hipocámpal y el parasubiculo. Los límites lateral y posterior son la corteza perirrinal y la corteza postrirrinal o parahipocámpal, respectivamente (Insausti y col., 1997; Van Groen, 2001; Canto y col., 2008) (Fig. 2.2).

Además, la CE se puede delimitar por los cambios en la intensidad de neuropilo marcado al emplear anticuerpos contra parvalbúmina o calretinina (Wouterlood y col., 1995; Insausti y col., 1997; Witter y col., 2000b; Van Groen, 2001; Canto y col., 2008). Mientras que con la PV la CE aparece con un neuropilo marcado muy intensamente en comparación con las cortezas adyacentes, con la CR el marcaje de la CE es más claro en general, aunque los plexos de las capas I y IV (lámina disecans) están más densamente teñidos (Fig. 2.3).

Por lo tanto, la delimitación de la CE se realizó teniendo en cuenta los límites con las estructuras adyacentes y la intensidad del marcaje del neuropilo con los distintos

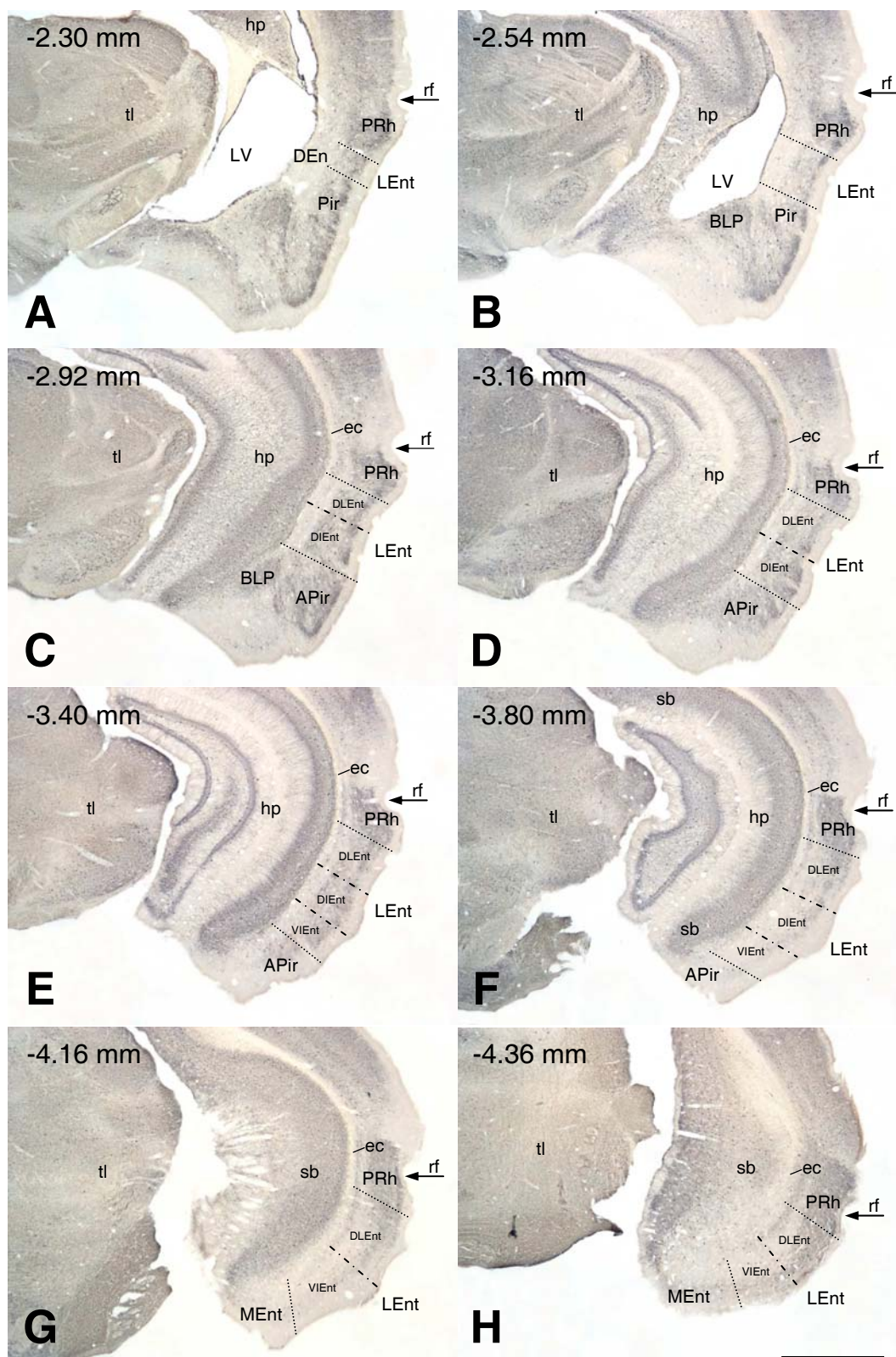


Figura 2.2. Delimitación de la corteza entorrinal lateral (LEnt) en secciones coronales seriadas rostro-caudalmente inmunomarcadas con anti-PV en un animal WT de 6 meses de edad. El área de la LEnt incluye las áreas dorsolateral (DLEnt), dorsal intermedia (DLEnt) y ventral intermedia (VLEnt), según Van Groen, 2001. Distancia de Bregma según Franklin y Paxinos, 2008. LEnt: corteza entorrinal lateral; DLEnt: corteza entorrinal dorsolateral; DLEnt: corteza entorrinal dorsal intermedia; VLEnt: corteza entorrinal ventral intermedia; MEnt: corteza entorrinal medial; PRh: corteza perirrinal; Pir: corteza piriforme; DEn: núcleo dorsal endopiriforme; rf: fisura rinal; hp: hipocampo; tl: tálamo; LV: ventrículo lateral; APir: transición amigdalopiriforme; BLP: núcleo de la amígdala basolateral posterior; ec: cápsula externa; sb: subículo. Barra de escala: 1 mm.

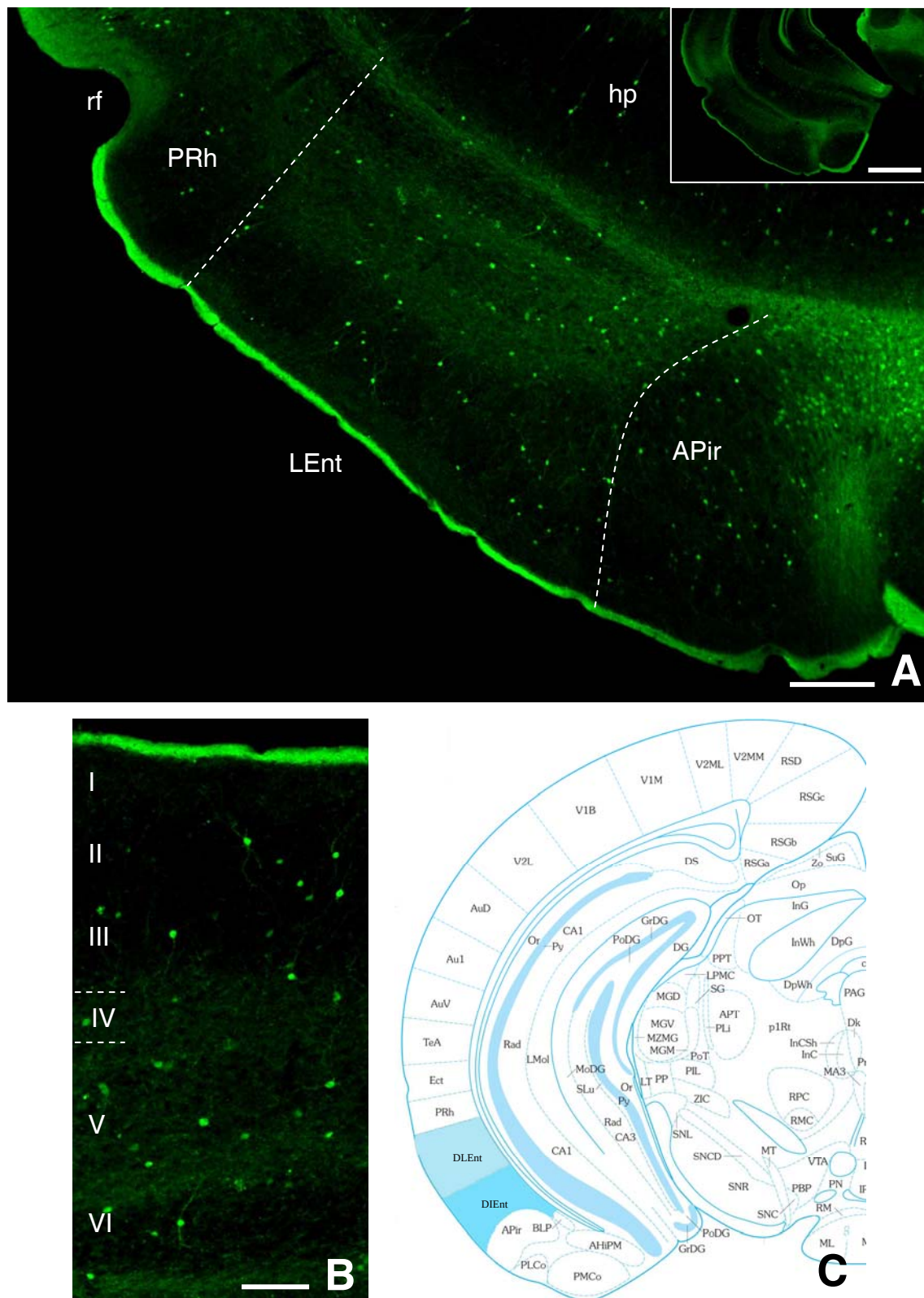


Figura 2.3. Delimitación de la corteza entorrinal lateral (LEnt) en sección coronal inmunomarcada con anti-CR en un animal WT de 6 meses de edad. A: Delimitación de la LEnt mediante inmunohistoquímica para calretinina. B: Delimitación de capas corticales. C: Esquema tomado de Paxinos 2008 de la zona delimitada. DLEnt: entorrinal dorsolateral; DLEnt: entorrinal dorsal intermedia; PRh: corteza perirrinal; rf: fisura rinal; hp: hipocampo; APir: transición amigdalopiriforme; números romanos: capas corticales. Barra de escala: 1mm (panorámica); 200 μ m (A); 100 μ m (B).

marcadores empleados, analizando la CE entre -2,06 hasta -4,60 mm posterior a las coordenadas de Bregman, según el atlas de Franklin y Paxinos (2008).

2.2. Estudios inmunohistoquímicos

2.2.1. Preparación del tejido

2.2.1.1. Proceso de fijación

Todos los animales (WT, PS1 y PS1xAPP) se anestesiaron profundamente con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (Dolethal[®], Vetoquinol) a una dosis de 60 mg/Kg y, a continuación, se perfundieron transcárdialmente. Para ello, se abrió la aurícula derecha y con ayuda de una bomba de perfusión (Dinko, D25V) se inyectó en el ventrículo izquierdo en primer lugar tampón fosfato salino (PBS) 0,1 M pH 7,4 (apéndice 2.10.1.) durante un minuto hasta lavar completamente el sistema circulatorio de sangre, seguido de 180 mL de la solución fijadora PLP (paraformaldehído 4%, L-lisina 75 mM y meta-peryodato sódico 10 mM) en tampón fosfato (PB) 0,1 M pH 7,4, durante unos 15 minutos (apéndice 2.10.2). Posteriormente, se extrajeron los cerebros y se post-fijaron por inmersión en la misma solución fijadora durante una noche a 4 °C.

El grupo de animales con dieta suplementada con litio y sus respectivos controles (mantenimiento) se decapitaron bajo una ligera anestesia tras los 6 meses de tratamiento, extrayéndose el cerebro en fresco. Los cerebros se cortaron en dos hemisferios, un hemisferio para estudios inmunohistoquímicos y el otro hemisferio para estudios bioquímicos y moleculares. Los hemisferios destinados a estudios bioquímicos se congelaron directamente, mientras que los destinados a inmunohistoquímica se fijaron durante 3 días por inmersión a 4°C en solución fijadora PLP, cambiando cada día el fijador con solución recién preparada. El procesamiento posterior fue similar al realizado con los demás animales empleados y que se detalla a continuación.

2.2.1.2. Crioprotección y congelación

Tras la fijación o post-fijación, los cerebros o hemisferios, se lavaron con tampón PBS (10 minutos 3 veces) y se crioprotegieron para evitar daños en la estructura del tejido durante el proceso de congelación. La crioprotección se realizó mediante inmersión en solución de sacarosa al 30% (apéndice 2.10.3.) hasta que el órgano se hunde en dicha solución. A continuación, los cerebros y hemisferios se congelaron con nieve carbónica durante 1 minuto y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior procesamiento.

2.2.1.3. Obtención de secciones

Los cerebros se cortaron en un microtomo de congelación (Leica, CM-1325) en secciones de 40 µm de grosor en plano coronal y se almacenaron de forma seriada *free-*

floating en pocillos que contenían PBS 0,1 M y 0,02% de azida sódica (para evitar el crecimiento fúngico). Las secciones se distribuyeron en 7 series, una serie en cada pocillo, de tal forma que dentro de una serie, los cortes consecutivos distaban entre sí 280 μ m. Por tanto, cada pocillo contiene una representación rostrocaudal de un 1/7 del total del cerebro. Esto permite la realización de una técnica distinta para cada serie (inmunohistoquímica simple, doble o múltiple, tinción histológica), de tal forma que podemos analizar múltiples marcadores y hacer un estudio comparativo en un mismo animal a lo largo del eje rostrocaudal. Las placas que contenían las secciones seriadas se almacenaron a 4 °C durante varios meses, renovando regularmente el tampón PBS con azida sódica.

Cada experimento estaba compuesto por un grupo de tamaño muestral n=3-6 animales, cada uno con un animal control (WT), un animal PS1 y un animal PS1xAPP.

2.2.2. Marcaje inmunohistoquímico

Las secciones de cerebro de los diferentes animales (WT, PS1 y PS1xAPP) y edades (2, 4, 6, 12 y 18 meses de edad) fueron siempre procesadas en paralelo, empleando las mismas soluciones para minimizar las condiciones de variabilidad en el proceso de inmunomarcaje.

2.2.2.1. Pretratamiento

En determinados casos, y previo a la incubación con los anticuerpos primarios, fue necesario realizar tratamientos específicos para aumentar la antigenicidad del tejido y así intensificar la señal inmunohistoquímica. En concreto, se han utilizado dos tratamientos:

- Permeabilización con detergente. Las secciones se preincubaron durante una noche a temperatura ambiente en PBS 0,1 M con Tritón X-100 al 0,2 %, lo que permite que el anticuerpo primario penetre a través de las membranas lipídicas celulares. Al día siguiente, se procedía al protocolo general de inmunohistoquímica.
- Tratamiento con calor. Tras lavar los cortes en tampón PBS (10 minutos 3 veces), los cortes se introdujeron 30 minutos en tampón citrato sódico 50 mM, pH 6 (apéndice 2.10.1) a 80 °C en el baño termostático (Unitronic, 320 OR; Selecta) en agitación. A continuación, se dejaron a temperatura ambiente durante 15 minutos en el mismo tampón y se lavaron tres veces en tampón PBS 0,1 M durante 10 minutos. Posteriormente, se procedió al protocolo convencional.
- Tratamiento con ácido fórmico. Se emplea con el anticuerpo A β ₄₂ con el fin de poder revelar la presencia de A β intracelular. Tras lavar los cortes en tampón PBS (10 minutos 3 veces), se introdujeron durante 7 minutos en ácido fórmico al 85% (141029.1611, Panreac) y se lavaron tres veces en tampón PBS 0,1 M durante 10 minutos. Posteriormente, se procedió al protocolo convencional.

Como paso previo al inmunomarcaje, los cortes se pretrataban siempre para inactivar la peroxidasa endógena por exceso de sustrato y bloquear la avidina/biotina endógenas y

las proteínas de unión a biotina del tejido para evitar así falsos positivos. Para ello, primero los cortes se lavaron cuatro veces en PBS 0,1M en agitación (agitador asimétrico tridimensional Heidolph Polymax 1040) durante 10 minutos para eliminar los restos de azida sódica y, a continuación, se trataron con H₂O₂ (hidrógeno peróxido 30%; 1.07210, Merk) al 3% y metanol (141091.1211, Panreac) al 10% en PBS 0,1 M pH 7,4 durante 20 minutos. Tras otros tres lavados con PBS, se empleó el kit de bloqueo de avidina-biotina (SP-2001; Vector Labs) durante 30 minutos en cada solución, con un paso intermedio de un lavado de 10 minutos en PBS.

2.2.2.2 Marcadores analizados mediante inmunohistoquímica

Los cortes se lavaron en PBS (10 minutos) y pasaron a incubarse en el anticuerpo primario de elección específico para uno de los antígenos (marcador) que aparecen en la siguiente tabla (Tabla 2.2):

Marcador	Característica
β-amiloide	Proteína amiloide generada tras el procesamiento del APP o proteína precursora amiloide.
β-amiloide 1-40	Péptido amiloide de 40 aminoácidos. Tiende a agregarse menos en forma de placa que los péptidos más largos.
β-amiloide 1- 42	Péptido amiloide de 42 aminoácidos. Constituyente principal de las placas extracelulares, ya que tiende a agregarse y generar formas fibrilares.
β-amiloide oligomérico	Formas oligoméricas del péptido amiloide. Se ha demostrado que son las especies más neurotóxicas.
APP	Proteína precursora amiloide. Su procesamiento por la presenilina genera la formación de distintos fragmentos de amiloide.
AT8	Este anticuerpo reconoce un epítipo de los filamentos helicoidales pareados de Tau sensible a la fosforilación (Ser202), correspondiente a Tau40 humano.
Bim	Miembro de la familia pro-apoptótica Bcl-2 que promueve la muerte celular al neutralizar sus homólogos anti-apoptóticos, los cuales mantienen la viabilidad celular regulando la actividad de las caspasas.
Caspasa 3 activada	Cisteín proteasa de la familia de las caspasas. Es una caspasa efectora cuya proteólisis conduce, finalmente, a la apoptosis a través de la vía intrínseca o mitocondrial.
CD11b	Receptor específico de superficie de las células microgliales activadas. También se denomina MAC-1 ó cadena M de la integrina alfa.
CD3	Receptor de superficie de los linfocitos T maduros. Pertenece a la superfamilia de las inmuno-globulinas y media en la transducción de señales tras el reconocimiento de los antígenos por la célula.
CR	Calretinina. Proteína ligadora de calcio que se expresa en las subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas que inhiben a otras interneuronas.
EEA1	Antígeno 1 del endosoma temprano. Es importante para la fusión de vesículas endocíticas recién formadas. Buen marcador de endosomas tempranos.
FAIM _L	Molécula inhibidora de la apoptosis mediada por Fas en su forma larga. Es un factor pro-supervivencia que evita la muerte neuronal por apoptosis inducida por receptores de muerte, ya que es un antagonista del receptor Fas.
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida que forma los filamentos intermedios de células astrogiales. Es un marcador específico de los astrocitos.
GM130	Proteína encargada de mantener la estructura de las membranas del aparato de Golgi y del transporte de vesículas. Buen marcador de las cisternas <i>cis</i> del Golgi.
GRP94	Proteína residente del retículo endoplásmico con actividad chaperona que se une a proteínas defectuosas (<i>Glucose Related Protein</i>).
Iba1	Molécula adaptadora (" <i>ionized calcium binding adapter molecule 1</i> ") que se expresa específicamente en microglía y monocitos activados. Suele asociarse con procesos inflamatorios crónicos.

IGF1	Factor de crecimiento insulínico. Es uno de los péptidos implicados en la mediación de la respuesta inmune, con propiedades neuroprotectoras.
IGF1R	Receptor de IGF-I. Tiene afinidad por la insulina, ya que tiene la misma estructura que el receptor de ésta. Posee funciones anti-apoptóticas.
IL4	Citoquina producida por linfocitos T activados. Regula la diferenciación de linfocitos T CD4 ⁺ a Th2 y la producción de inmunoglobulinas por los linfocitos B.
iNOS	Sintasa del óxido nítrico en su forma inducible o tipo II. El óxido nítrico es un gas inorgánico que interviene en la vasodilatación, la neurotransmisión y la citotoxicidad. Se expresa en células gliales activadas.
LAMP2	Proteína lisosomal asociada a membrana. Interviene en procesos de autofagia. Es un buen marcador de lisosomas.
MAP2	Principal proteína asociada a microtúbulos del sistema nervioso. Promueve el ensamblaje de microtúbulos e interacciona con neurofilamentos, actina y otros elementos del citoesqueleto.
NeuN	Marcador específico de núcleos de neuronas maduras de vertebrados.
NF	Neurofilamento. Es una proteína de los filamentos intermedios implicados en el mantenimiento del citoesqueleto neuronal, principalmente en los axones.
NPY	Neuropéptido Y. Producido por una subpoblación de interneuronas GABAérgicas. Está implicado en la inhibición presináptica de la liberación de neurotransmisores y facilita la retención de memoria.
PV	Parvalbúmina. Proteína ligadora calcio expresada en determinadas subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas, como las células en cesto.
Reelina	Proteína que interviene en el proceso de migración celular y posicionamiento durante el desarrollo cerebral. Estimula el desarrollo de las dendritas y las espinas dendríticas. En el adulto regula la plasticidad sináptica manteniendo la LTP.
Sinaptofisina	Glucoproteína presente en la membrana de las vesículas pre-sinápticas neuronales. Marcador de sinapsis.
SOM	Somatostatina. Neuropéptido sintetizado por una subpoblación de interneuronas GABAérgicas, como por ejemplo las células de Martinotti en la corteza cerebral.
TGN38	Proteína integral de membrana que interviene en la formación de vesículas desde la red <i>trans</i> del Golgi. Marcador del trans Golgi.
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa. Es una citoquina pro-inflamatoria producida principalmente por macrófagos activados. Activa la vía extrínseca de la apoptosis.
TNFR1	Receptor de superficie del TNF α . Perteneciente a la superfamilia de receptores NGF (" <i>nerve growth factor</i> ") y posee un dominio muerte, necesario para la transducción de la señal apoptótica a través de TRADD y FADD.
VGAT	Transportador vesicular GABA. Es una proteína integral de membrana de vesículas sinápticas que contienen neurotransmisores inhibidores, como el GABA. Marcador de sinapsis GABAérgicas.
VGLUT1	Transportador Vesicular de Glutamato. Transporta glutamato al interior de las vesículas sinápticas. Marcador de sinapsis glutamatérgicas.
VIP	Péptido intestinal vasoactivo. Es un neurotransmisor, perteneciente a la familia del glucagón generado por una subpoblación de interneuronas GABAérgicas.
Ym1	Proteína de la familia de las quitinasas que se une a glucosaminoglucanos (denominada AMCase en humanos) producida por los macrófagos activados mediante la vía alternativa (M2), principalmente los M2a.

Tabla 2.2. Marcadores analizados mediante inmunohistoquímica. A la izquierda de la tabla se muestran las abreviaturas de todos los marcadores analizados mediante inmunohistoquímica y, a la derecha, se describe su naturaleza y algunas de sus características principales.

2.2.2.3. Inmunohistoquímica simple para campo claro

Las secciones se incubaron en agitación continua, en uno de los anticuerpos primarios diluidos en PBS 0,1 M con 0,2% de Tritón X-100 y 0,1% de azida sódica en las

condiciones (dilución de uso, tiempo y temperatura de incubación) que se muestran en la tabla 2.3. Tras la incubación, los cortes se lavaron en tampón PBS (10 minutos 3 veces).

Anticuerpo primario	Especie	Casa comercial Referencia	Dilución	Tiempo (horas)	Temperatura (°C)
6E10 (Anti-A β)	Ratón	Sigma-Aldrich (A 1474)	1/1.500	24	22
Anti-A β ₁₋₄₀	Conejo	Biosource (44-348)	1/40	24	22
Anti-A β ₁₋₄₂	Conejo	Biosource (44-344)	1/40	24	22
M71/3 (Anti- A β oligomérico)	Conejo	Dr. Klein (Illinois, USA)	1/1.500	24	22
NU4 (Anti- A β oligomérico)	Ratón	Dr. Klein (Illinois, USA)	1/2.000	48	22
Anti-hAPP-C	Conejo	Sigma-Aldrich (A8717)	1/20.000	24	22
Anti-AT8	Ratón	Pierce Biotech. (MN1020)	1/500	24	22
Anti-Bim	Conejo	Santa Cruz Bioteth. (H-271, Sc-7895)	1/500	72	4
Anti-Caspasa3 activada	Conejo	Cell Signaling (9661)	1/100	72	22
Anti-CD11b	Rata	Serotec (MCA711)	1/150.000	24	22
Anti-CD3	Hámster	BD (550277)	1/100	48	22
Anti-CR	Conejo	Swant (7696)	1/5.000	24	22
Anti-EEA1	Conejo	Affinity Bioreagents (PA1-063)	1/200	72	22
Anti-FAIM _L	Conejo	Dr. Comella (Univ. Lérida)	1/2.000	24	4
Anti-GFAP	Pollo	Chemicon (AB5541)	1/2.000	24	22
Anti-GM130	Conejo	Abcam (Ab52649)	1/500	72	22
Anti-GRP94	Conejo	Abcam (Ab13509)	1/2.000	72	22
Anti-Iba1	Conejo	Wako Chemicals (019-19741)	1/1.000	24	22
Anti-IGF1	Conejo	Santa Cruz Bioteth. (Sc-9013)	1/500	72	22
Anti-IGF1R	Conejo	Abcam (Ab39675)	1/100	24	22
Anti-IGF1RP	Conejo	Abcam (Ab39398)	1/50	72	4
Anti-IL4	Cabra	Santa Cruz Bioteth. (Sc-1260)	1/250	72	22
Anti-iNOS	Conejo	Transduction Laboratories (N 32030)	1/1.000	24	22
Anti-LAMP2	Conejo	Abcam (Ab37024)	1/50	48	22
Anti-MAP2	Conejo	Chemicon (AB5622)	1/5.000	24	22
Anti-NeuN	Ratón	Chemicon (MAB377)	1/1.000	72	4
Anti-NF	Conejo	Chemicon (AB1981)	1/5.000	24	22
Anti-NPY	Conejo	Sigma-Aldrich (N 9528)	1/5.000	48	22
Anti-PV	Conejo	Swant (PV-28)	1/5.000	48	22
Anti-Reelina	Ratón	Chemicon (MAB5364)	1/1.000	24	22
Anti-Sinaptofisina	Conejo	Abcam (Ab14692)	1/1.000	24	22
Anti-SOM	Cabra	Santa Cruz Bioteth. (D-20, Sc-7819)	1/1.000	24	22
Anti-TGN38	Conejo	Abcam (Ab16059)	1/5.000	48	22
Anti-TNF α	Rata	Abcam (Ab34719)	1/100	48	22
Anti-TNFR1	Conejo	Santa Cruz Bioteth. (H-271, Sc-7895)	1/500	24	22

Anti-VGAT	Cobaya	Calbiochem (676780)	1/5.000	72	22
Anti-VGluT1	Cobaya	Chemicon (AB5905)	1/10.000	24	22
Anti-VIP	Conejo	ImmunoStar (20077)	1/5.000	24	22
Anti-Ym1	Cabra	Santa Cruz Bioteth. (Sc-49355)	1/100	48	22

Tabla 2.3. Anticuerpos primarios empleados en la inmunohistoquímica. En la tabla se muestra el anticuerpo empleado, la especie en la que está desarrollado, la casa comercial junto con la referencia, la dilución a la que se han empleado en el periodo de incubación, el tiempo de incubación en horas y la temperatura de incubación del anticuerpo. Los anticuerpos producidos en ratón son todos monoclonales. El resto de anticuerpos son policlonales.

A continuación, se cita el antígeno que reconoce algunos de los anticuerpos empleados:

- Anti-hAPP-C: reconoce el fragmento C-terminal de la proteína precursora amiloide humana desde el aminoácido 676 al 695.
- Anti-A β 6E10: reconoce los primeros 17 residuos aminoacídicos del péptido β -amiloide.
- Anti-A β ₄₀: reconoce de forma específica el péptido amiloide de 40 aminoácidos.
- Anti-A β ₄₂: reconoce de forma específica el péptido amiloide de 42 aminoácidos.
- Anti-A β oligomérico M71/3: anticuerpo policlonal que reconoce las formas oligoméricas de 12 a 24 monómeros.
- Anti-A β oligomérico NU-4: anticuerpo monoclonal que reconoce las formas oligoméricas del β -amiloide.
- Anti-Ym1: reconoce específicamente la microglía activada mediante la vía alternativa.

La unión específica del anticuerpo primario al tejido se detectó incubando durante 1 hora con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente (Tabla 2.4), a una dilución de 1/500 en el mismo diluyente que el anticuerpo primario. A continuación, las secciones se lavaron en tampón PBS (10 minutos 3 veces), se incubaron durante 90 minutos en una solución de ExtrAvidin® conjugada a peroxidasa (Sigma-Aldrich, E-2886) a una dilución 1/2.000 en PBS con 0,2% de Tritón X-100 y, posteriormente, se lavaron en PBS (10 minutos 3 veces).

<i>Anticuerpo 2º</i>	<i>Especie de obtención</i>	<i>Referencia</i>
Anti-IgG de cabra	Caballo	BA-9500
Anti-IgG de conejo	Cabra	BA-1000
Anti-IgG de hámster	Cabra	BA-9100
Anti-IgG de cobaya	Cabra	BA-7000
Anti-IgG de pollo	Cabra	BA-9010
Anti-IgG de ratón	Cabra	BA-9200
Anti-IgG de rata	Cabra	BA-9400

Tabla 2.4. Anticuerpos secundarios empleados en la inmunohistoquímica. La tabla muestra los anticuerpos secundarios empleados, la especie en la que están desarrollados y su referencia. La casa comercial que los suministra es Vector Labs.

Para visualizar la reacción de la peroxidasa, las secciones se incubaron en una solución de 3-3'-diaminobencidina tetrahidro-clorhídrico (DAB) al 0,05 % (D5637, Sigma-Aldrich) en tampón Tris clorhídrico 50 mM (T1503 Trizma®, Sigma-Aldrich) conteniendo 0,03% de níquel sulfato amónico (464545, Farmitalia Carlo Erba) y peróxido de hidrógeno (1.07210., Merck) al 0,01%. El tiempo de incubación en la solución de revelado viene determinado por la intensidad de la señal inmunohistoquímica deseada (máxima señal con el mínimo fondo inespecífico) y que era monitorizada bajo el microscopio.

Finalmente, las secciones se montaron en portaobjetos gelatinizados (apéndice 2.10.4.) y se dejaron secar al aire libre y después en la estufa a 37 °C durante una noche. A continuación, se procedió a la deshidratación en etanol de gradación ascendente (50º, 70º, 96º y 100º), seguido del aclaramiento en xileno y el montaje final con el cubreobjetos, utilizando como medio de montaje dibutil ftalato ó DPX (360294H, BDH), que es soluble en xileno (apéndice 2.10.5).

2.2.2.4. Inmunohistoquímica doble para campo claro (SOM/NeuN)

El inmunomarcaje doble con peroxidasa, ya sea con dos o más anticuerpos primarios, consta de dos procesos de revelado consecutivos, donde el primero de los productos de reacción es azul oscuro, al emplearse níquel junto al DAB y el segundo es de color marrón, proporcionado por el DAB sólo. Este tipo de inmunomarcaje es factible sólo cuando los anticuerpos primarios, desarrollados en especies distintas, reconocen antígenos de tipos celulares diferentes, o bien, los antígenos de un mismo tipo celular que estén localizados en compartimentos diferentes, como el citoplasma y el núcleo.

Para la inmunohistoquímica doble con anti-SOM y anti-NeuN, se procedió como se ha explicado en el apartado anterior para la inmunohistoquímica simple, es decir, los cortes se trataron previamente para desactivar la peroxidasa endógena y bloquear la avidina y biotina endógenas y, a continuación, se incubaron en el primero de los anticuerpos primarios, el que se desee visualizar con color azul (en este caso la SOM), seguido del anticuerpo secundario biotinilado específico y la estreptavidina. Finalmente, se reveló el producto de reacción empleando los mismos reactivos que se detallan en el apartado anterior, quedando el marcaje (citoplasmático) en color azul. Tras este paso, los cortes se lavaron en PBS (10 minutos 3 veces) y se procedió a la incubación en el segundo anticuerpo primario (NeuN) que se revelará en color marrón (los núcleos neuronales aparecerán de este color) y que no debe estar desarrollado en la misma especie que el otro anticuerpo primario. Tras este paso, se procedió a la incubación de su anticuerpo secundario específico y de la estreptavidina. Por último, se reveló con DAB, omitiendo la adición de níquel, que al no precipitar junto con el DAB, el marcaje aparece de color marrón (Fig. 2.4).

Finalmente, las secciones se montaron en portaobjetos gelatinizados, se dejaron secar durante una noche a 37 °C, se deshidrataron en una batería de etanol de gradación ascendente, se aclararon con xileno y se cubrieron usando DPX.

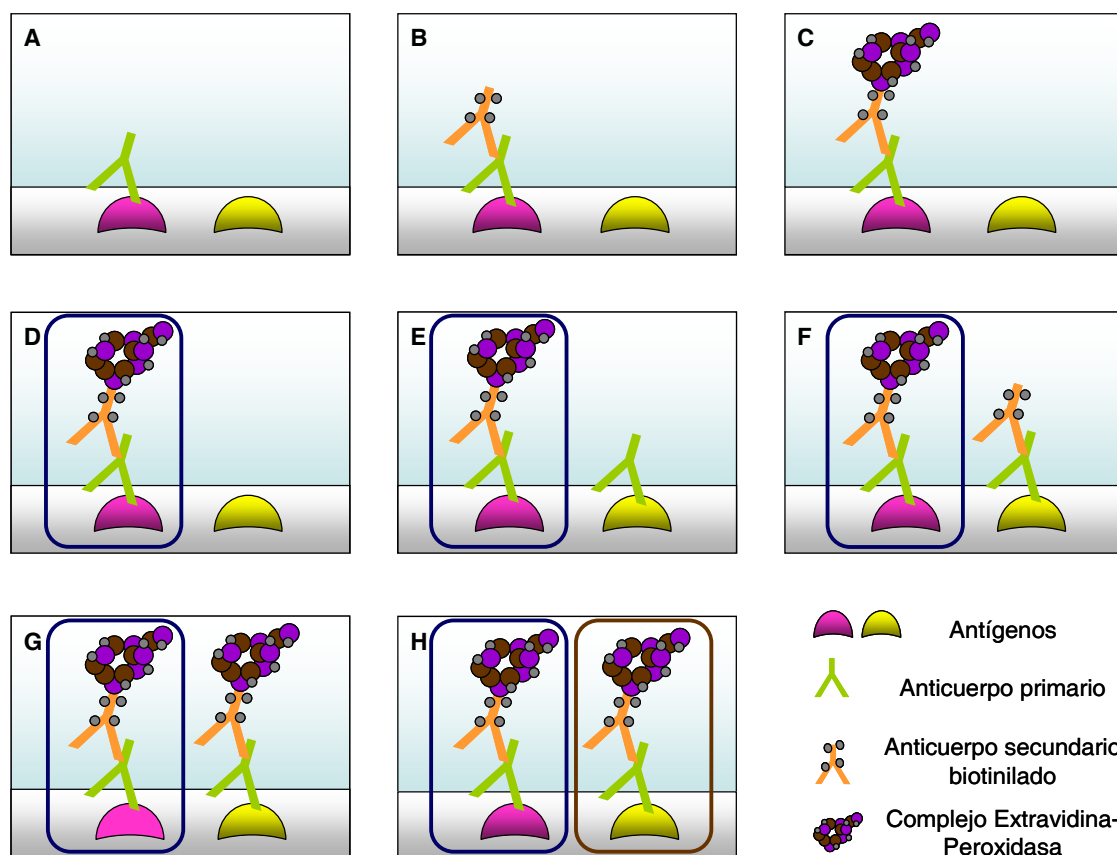


Figura 2.4. Esquema de la inmunohistoquímica doble para microscopía convencional de campo claro. A. Adición del primer anticuerpo primario; B. Adición del primer anticuerpo secundario biotinilado; C. Adición del complejo peroxidasa; D. Adición del sustrato de la enzima DAB-Níquel (azul grisáceo); E. Adición del segundo anticuerpo primario; F. Adición del segundo anticuerpo secundario biotinilado; G. Adición del complejo peroxidasa; H. Adición del sustrato de la enzima DAB (marrón).

2.2.2.5. Inmunohistoquímica múltiple (5x) a microscopía de campo claro para diferenciar células principales de interneuronas

Cuando se emplea una batería de varios anticuerpos el proceso no difiere mucho de este anterior. Este tipo de marcaje múltiple empleando 5 anticuerpos primarios (anti-SOM, anti-PV, anti-VIP, anti-CR y anti-NeuN), se diseñó para diferenciar las células principales de las interneuronas GABAérgicas. Se eligió este complejo procedimiento experimental en lugar del clásico inmunomarcaje con anticuerpos contra GABA o GAD67 para el marcaje de todas las interneuronas porque observamos que el número de somas inmunopositivos para estos marcadores siempre era menor que el número de somas marcados empleando anticuerpos contra SOM o PV, que son subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas. Estas diferencias también han sido observadas por otros autores (Wouterlood y Pothuizen, 2000). Esta diferencia entre los diferentes inmunomarcajes puede deberse a la distinta preservación del antígeno que reconocen los anticuerpos en el tejido, la penetración del anticuerpo, la localización intracelular del epítipo (en el cuerpo celular o en los botones axonales) o simplemente debido a que las interneuronas GABAérgicas no son uniformes en

cuanto a los niveles de GABA o GAD67 que contienen, por lo que existen diferencias en su detección inmunohistoquímica.

En el día 1, se realizaron los bloqueos de peroxidasa endógena y de avidina/biotina y se procedió a la incubación secuencial con los anticuerpos primarios específicos para interneuronas que expresan SOM, PV, CR y VIP, de uno en uno, cubriendo así casi todos los tipos de interneuronas corticales según su contenido neuroquímico (Miyoshi y col., 2007). Cada anticuerpo primario se incubó una noche. Tras las 24 horas de incubación del anticuerpo contra SOM, los cortes se lavaron con PBS 0,1 M (10 minutos 3 veces) y, a continuación, se pasó a la incubación del anticuerpo anti-PV, y así consecutivamente con anti-CR y anti-VIP, hasta el día 4. Tras la incubación con este último anticuerpo primario, en el día 5, se procedió a la incubación con los anticuerpos secundarios biotinilados específicos para los respectivos anticuerpos primarios (anti-cabra para SOM y anti-conejo para los otros tres), seguido de la incubación en estreptavidina y revelado con DAB-Ni. De este modo se consigue que las interneuronas presenten un marcaje azulado en el soma y sus prolongaciones. Tras el revelado, se procedió al lavado de los cortes con PBS (10 minutos 3 veces) y la incubación con el anticuerpo anti-NeuN durante tres noches a 4 °C, hasta el día 8. Posteriormente, el día 9, se incubaron los cortes en el anticuerpo secundario biotinilado específico (anti-ratón) y en la estreptavidina-peroxidasa, seguido del revelado del producto de inmunorreacción, esta vez únicamente con DAB. Así, se consigue que todas las neuronas maduras posean un marcaje nuclear de color marrón (Fig. 2.5). De este modo, las interneuronas tendrán un doble marcaje (azul en el citoplasma y marrón en el núcleo), mientras que el resto de las neuronas (las células principales) presentarán sólo un marcaje nuclear marrón. Finalmente, las secciones se montaron y se deshidrataron como se ha mencionado en el apartado anterior.

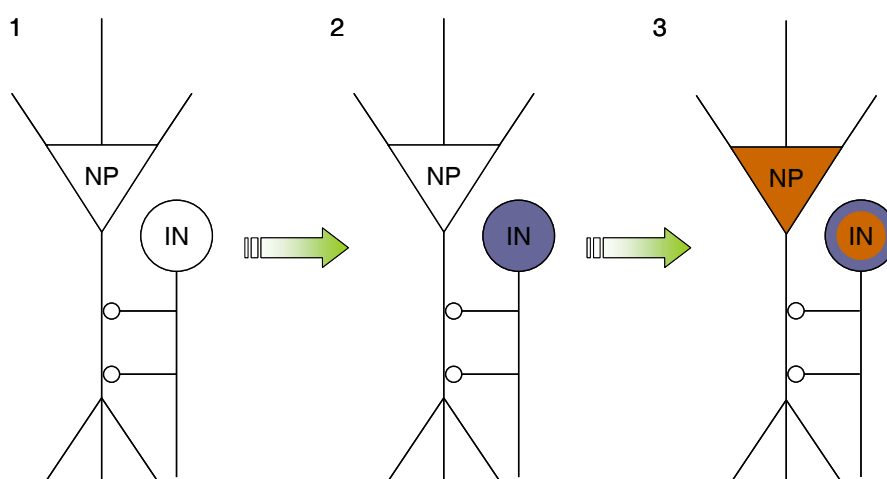


Figura 2.5. Esquema de la inmunohistoquímica múltiple para el marcaje diferencial de interneuronas y células principales corticales a microscopía convencional de campo claro. De izquierda a derecha: 1.- Representación de los tipos neuronales de la corteza en el tejido sin procesar (NP: Neurona principal; IN: interneurona). 2.- Las interneuronas se marcan en azul tras el revelado con DAB-Ni de los anticuerpos específicos para el contenido neuroquímico de las interneuronas (SOM, PV, CR y VIP). 3.- Finalmente, tanto las interneuronas como las neuronas principales se marcan en marrón con NeuN tras revelar con DAB, quedando las células principales con marcaje nuclear marrón y las interneuronas con doble marcaje.

Se procesaron los controles apropiados para evitar cualquier falso positivo debido a la reactividad cruzada entre los sistemas de revelado (omisión de los anticuerpos primarios). Para una discriminación inequívoca de las diferentes reacciones de peroxidasa-estreptavidina, la primera (para interneuronas) fue siempre realizada con DAB-níquel (azul), mientras que la segunda (NeuN) se realizó sólo con DAB (marrón claro). Además, la diferente localización espacial (compartimento celular) de los epítopes para interneuronas (citoplasma) y NeuN (núcleos) garantizaba completamente la correcta visualización no solapada de ambas reacciones y, por tanto, la interpretación de los resultados.

2.2.2.6. Marcaje inmunofluorescente doble para microscopía convencional de fluorescencia y microscopía láser confocal

Para el inmunomarcaje fluorescente doble, las secciones se incubaron con el primer anticuerpo primario y, posteriormente, tras tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS, se incubaron con el segundo anticuerpo primario, guardando los tiempos de incubación específicos de cada anticuerpo. A diferencia de la inmunohistoquímica doble para campo claro, no se realiza primero el marcaje y revelado de un anticuerpo y posteriormente el otro, sino que los dos anticuerpos primarios se incuban en días consecutivos y, posteriormente, se incuban los cortes con ambos anticuerpos secundarios el mismo día.

El marcaje se visualizó con dos anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromo Alexa (Tabla 2.5) o con un anticuerpo secundario fluorescente Alexa y un anticuerpo secundario biotinilado (Tabla 2.4 y 2.5) acoplado a estreptavidina fluorescente, dependiendo de la especie de origen de los anticuerpos primarios y secundarios, que emiten en verde (Alexa 488) o en rojo (Alexa 568) (Tabla 2.6), según el esquema que se muestra en la Fig. 2.6.

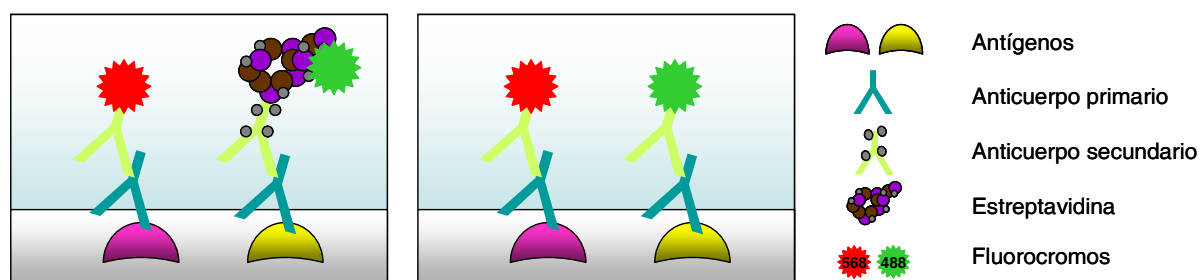


Figura 2.6. Esquema de la inmunohistoquímica doble para microscopía de fluorescencia. En el esquema se muestran las dos combinaciones que se han empleado en los dobles marcajes fluorescentes. A la izquierda, empleando un anticuerpo secundario acoplado a un fluorocromo para uno de los anticuerpos primarios y un anticuerpo secundario biotinilado y estreptavidina acoplada a un fluorocromo distinto para el otro anticuerpo primario. A la derecha, empleando para ambos primarios dos anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos distintos.

Reactivo	Fluorocromo	Especie de obtención	Referencia	Casa Comercial	Dilución
Anti-IgG de rata	Alexa 488	Burro	A-21208	Molecular Probes	1/1.000
Anti-IgG de ratón	Alexa 488	Burro	A-21202	Molecular Probes	1/1.000
Anti-IgG de conejo	Alexa 488	Cabra	A-11008	Molecular Probes	1/1.000
Anti-IgG de conejo	Alexa 568	Cabra	A-11011	Molecular Probes	1/1.000
Anti-IgG de ratón	Alexa 568	Cabra	A-11004	Molecular Probes	1/1.000
Anti-IgG de cabra	Alexa 568	Burro	A-11057	Molecular Probes	1/1.000
Anti-IgG conejo biotinilado	-	Burro	RPN1004V1	Amersham	1/200
Estreptavidina	Alexa 488	-	S-32354	Molecular Probes	1/1.000
Estreptavidina	Alexa 568	-	S-11226	Molecular Probes	1/1.000

Tabla 2.5. Anticuerpos secundarios y fluorocromos empleados en la inmunohistoquímica fluorescente.

Según la combinación de anticuerpos primarios y en qué especie animal estén desarrollados, se emplea una combinación de fluorocromos específica. En la tabla se especifica el fluorocromo o anticuerpo empleado, la especie de obtención de los anticuerpos, su referencia, casa comercial y concentración de uso.

Fluorocromo	Absorción (nm)	Emisión (nm)
Alexa 488	495	519
Alexa 568	578	603

Tabla 2.6. Longitudes de onda de absorción y emisión de los fluorocromos empleados. En esta tabla se muestran las longitudes de onda de absorción y emisión de los fluorocromos empleados en la inmunofluorescencia para microscopía confocal.

En algunas ocasiones se combinó una inmunohistoquímica fluorescente empleando un anticuerpo primario acoplado a un secundario fluorescente junto con una tinción fluorescente para células microgliales (lectina de tomate) o placas amiloides fibrilares (Tioflavina-S) (ver más adelante la descripción de estas tinciones específicas en los apartados 2.3.2 y 2.3.3, respectivamente).

En la tabla 2.7, se muestran las combinaciones realizadas en el presente trabajo de dos anticuerpos primarios, o bien, un anticuerpo primario y una tinción histoquímica en los estudios de fluorescencia doble.

Las secciones se montaron en portaobjetos gelatinizados y se cubrieron usando como medio de montaje PBS 0,1M y glicerina (1:1) y 3% de 1,4-diazabicio [2.2.2.]-octano (DABCO) (apéndice 2.10.6), que mantiene la fluorescencia de las muestras durante mayor tiempo y evita el fotoblanqueamiento por el láser. Para finalizar, las secciones se analizaron en un microscopio láser confocal (Leica TCS-NT).

Marcador	Combinación																Fluorocromo
Aβ 6E10																	Ac 2º Alexa 488
Aβ NU4																	Ac 2º 488/568
APP																	Ac 2º Alexa 568
CD11b																	Ac 2º Alexa 568
CD3																	Ac 2º Alexa 488
EEA1																	Estreptavidina 488
GFAP																	Ac 2º 488/568
GM130																	Estreptavidina 488
GRP94																	Estreptavidina 488
IGF1																	Estrept. 488/568
IL4																	Estreptavidina 568
iNOS																	Estreptavidina 488
LAMP2																	Estreptavidina 488
LT																	Estrept. 488/568
NeuN																	Estreptavidina 568
NPY																	Ac 2º Alexa 488
SOM																	Ac 2º Alexa 568
TGN38																	Estreptavidina 488
TS																	Emite en verde
VGAT																	Estreptavidina 488
VGluT1																	Estreptavidina 488
Ym1																	Ac 2º Alexa 568

Tabla 2.7. Combinación de anticuerpos y tinciones fluorescentes empleadas en microscopía fluorescente. En esta tabla se muestran los anticuerpos primarios empleados, así como las tinciones histoquímicas, a la izquierda. En la columna central aparecen las combinaciones realizadas entre ellos, y a la derecha, los fluorocromos empleados en cada combinación.

2.2.2.7. Controles de la técnica inmunohistoquímica

Como **control negativo** de la técnica inmunohistoquímica para microscopía de campo claro y de fluorescencia, en cada experimento se procesaron simultáneamente secciones en las que se omitió el paso de incubación en el anticuerpo primario (o anticuerpos primarios) correspondientes, sustituyendo este paso por una incubación en el tampón de dilución. En todos los casos, los controles negativos no presentaron inmunotinción alguna, demostrando la especificidad de la técnica.

En todos los diseños experimentales inmunohistoquímicos se procesaron conjuntamente secciones de ejemplares de los diversos genotipos (WT, PS1 y PS1xAPP). Así mismo, cuando se comparaban distintas edades, se procesaban siempre de forma simultánea animales de las diferentes edades (2, 4, 6, 12 y 18 meses de edad), de tal manera que se minimizaba cualquier variación en la intensidad del inmunomarcaje debido a la técnica.

2.3. Tinciones histológicas

2.3.1. Tinción general de células con Violeta de Cresilo

El colorante violeta de cresilo ($C_{18}H_{15}N_3O_3$; C1791; Sigma-Aldrich), se une a moléculas de naturaleza basófila como el ARN, ADN y proteínas asociadas localizadas en el núcleo y dispersas también en forma de gránulos por el citoplasma. Con este método se tiñen todos los núcleos celulares y los acúmulos de retículo endoplásmico del citoplasma (grumos de Nissl). El violeta de cresilo se emplea al 1% diluido en agua desionizada. A esta mezcla se le añade ácido acético glacial como mordiente, en una concentración final del 1%.

Para proceder a esta tinción, los cortes se montaron previamente sobre portaobjetos gelatinizados y se dejaron durante una noche en la estufa a 37 °C para que su completa adhesión. Tras esto, los tejidos se hidrataron durante 30 minutos en PBS, 10 minutos en agua destilada y, a continuación, se sumergieron en la solución de violeta de cresilo durante 7 minutos. Se lavaron 2 minutos en agua destilada para eliminar el exceso de colorante y se procedió a la deshidratación: 1 minuto en etanol de 70° y 2 minutos en etanol de 96° con ácido acético al 10%, que actúa de mordiente. Después, se pasaron 4 minutos por etanol absoluto y 10 minutos en xileno. Finalmente, se cubrieron con DPX.

2.3.2. Marcaje fluorescente de células microgliales con Lectina de Tomate

Las células microgliales pueden marcarse de forma específica tanto con anticuerpos (anti-CD11b) como con lectina de tomate (Acarin y col., 1994). La lectina de tomate (B-1175; Vector Laboratories) marca de forma específica la microglía, ya que reconoce concretamente los residuos de N-acetil-galactosamina de las formas ramificadas y ameboides de la microglía. También marca las células endoteliales y los plexos coroideos, pero nunca se une a neuronas, astrogía ni oligodendroglía.

La lectina de tomate se ha usado en el presente trabajo de forma combinada con otros anticuerpos para microscopía confocal doble fluorescente, de tal manera que primero se incubó con un anticuerpo primario (6E10, Ym1 o IGF1) y, tras tres lavados con PBS de 10 minutos cada uno, se pasó a incubar con la lectina de tomate durante 1 hora a 37 °C en el baño termostático en agitación, a una dilución de 5 µg/mL. Debido a que este compuesto está biotinilado, el tejido se incubó posteriormente en estreptavidina fluorescente y el anticuerpo secundario fluorescente específico para el anticuerpo primario. Finalmente, se procedió como se ha descrito en el apartado anterior, cubriendo las muestras con DABCO y el cubreobjetos.

2.3.3. Marcaje fluorescente de placas amiloides fibrilares con Tioflavina-S

La Tioflavina-S (TS) es una fluoresceína verde que se une de forma específica a las placas seniles que poseen una conformación de hoja β plegada y a los ovillos neurofibrilares.

Las secciones se lavaron durante 10 minutos tres veces en PBS 0,1 M y se incubaron 5 minutos en la solución de TS (T1892; Sigma-Aldrich) al 0,025 % en etanol al 50% en oscuridad y agitación. Tras este paso, los cortes se lavaron dos veces en etanol al 50% durante 5 minutos y dos veces en agua destilada durante 5 minutos. Luego, se montaron en portaobjetos gelatinizados, se dejaron secar al aire libre para que se adhirieran y, finalmente, se colocó el cubreobjetos con medio de montaje DABCO. Las muestras se conservaron a 4 °C y en oscuridad.

Para realizar una tinción doble de TS junto con una inmunohistoquímica fluorescente, primero se realizó el inmunomarcaje fluorescente según el protocolo mencionado anteriormente para inmunohistoquímica fluorescente, empleando un anticuerpo secundario acoplado con Alexa 568, que emite en rojo. Posteriormente, se realizaron tres lavados en PBS y se incubó en TS, diluida en etanol de 50º a una concentración de 0,025%. Finalmente, se lavaron en PBS tres veces, se montaron en portaobjetos gelatinizados y se cubrieron los cortes con DABCO, manteniendo las muestras a 4 °C.

2.3.4. Marcaje fluorescente nuclear con DAPI

El fluorocromo azul DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorhídrico) (D9542; Sigma-Aldrich) se une de forma específica al surco menor de la doble cadena de ADN, en regiones ricas en A-T. Su longitud de onda de absorción es de 364 nm, mientras que su emisión se produce a 454 nm.

La contratinción con DAPI permite la visualización de los núcleos celulares (neuronas y glía) en combinación con una inmunohistoquímica doble, obteniendo un triple marcaje fluorescente en rojo, verde y azul que emiten en longitudes de onda que no se solapan. Tras la realización de la inmunohistoquímica doble y antes de montar los cortes en el portaobjeto, el tejido se introduce durante 10 segundos en la solución acuosa de DAPI, que se encuentra a una concentración 1/250, momento tras el cual, los tejidos se lavan tres veces en tampón PBS y se pasa a su montaje sobre los portaobjetos, empleando el medio de montaje para fluorescencia DABCO.

2.3.5. Tinción de placas amiloides fibrilares con Rojo Congo

El rojo congo ($C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$) (C6277; Sigma-Aldrich) se usa de forma específica para el marcaje de β -amiloide fibrilar. Se desconoce el sustrato de unión específico al que se une el colorante, aunque se cree que puede unirse a la conformación plegada en hoja β . Esta tinción es visible tanto a microscopía óptica convencional como a microscopía fluorescente.

La solución de rojo congo se realiza al 20% de rojo congo puro diluido en etanol absoluto, diluyendo previamente en el rojo congo cloruro sódico con una concentración final del 3%. En esta solución, tras su filtrado, se incubaron los tejidos durante 3-5 minutos, seguido de dos lavados de 10 minutos en agua destilada y un último lavado de 10 minutos en PBS. Los cortes se pueden preparar para visualizarlos a microscopía óptica, realizando

una deshidratación con alcoholes y montando los portaobjetos con DPX, o para microscopía fluorescente, empleando el medio de montaje DABCO.

En ocasiones, como ocurre con el marcaje con IGF1, CD3, TNF α , Iba1, APP, SOM, MAP2, NF, sinaptofisina o Bim, se puede realizar una contratinción con rojo congo, para conocer la distribución de los marcadores respecto a las placas de β -amiloide. Para ello, tras el revelado con DAB-níquel de la inmunohistoquímica, se procede al protocolo anteriormente descrito para el rojo congo y, por último, las secciones se montan en los portaobjetos, se dejan secar, se deshidratan y se cubren empleando DPX.

2.4. Obtención de imágenes microscópicas

2.4.1. Imágenes para microscopía convencional de campo claro

Las imágenes de inmunohistoquímica de DAB, DAB-níquel o de tinciones histológicas generales 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 mega píxeles, conectada a un ordenador que ejecutaba el programa ACT-2U ("Auto Camera Tame To You"; Imaging Software, Nikon Corporation 2004), tomadas con un tamaño de 2560x1920 en formato jpg.

2.4.2. Imágenes para microscopía de fluorescencia

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

Las imágenes de fluorescencia a microscopía confocal fueron obtenidas con el microscopio láser confocal Leica TCS-NT, conectado a un ordenador que ejecutaba el programa Leica TCS-NT. Se trata de un microscopio óptico convencional al que se le acopla como fuente de iluminación un rayo láser y un sistema electrónico que permite la captación de las imágenes digitales. Se obtienen secciones ópticas extremadamente finas, siendo el plano focal de 0,4 μ m, determinado por un *pinhole* de 0,8-1, eliminando la interferencia de la luz que proviene de otras fuentes. Permite conocer la colocalización de dos o más moléculas en una misma célula, entre otras aplicaciones. Finalmente, se adquieren fotos digitales de tamaño 1024x1024 en formato tiff. Para las imágenes de pseudo-3D, se tomaron series de unas 20 fotografías, separadas entre ellas por 0,5 μ m, de forma consecutiva.

2.4.3. Procesamiento de imágenes

Las imágenes digitales fueron procesadas con el programa informático Adobe PhotoShop CS (7.0), modificándose el tamaño y el brillo/contraste (de toda la imagen) en aquellas ocasiones en las que fuera necesario. Las series de imágenes para pseudo-3D, se

procesaron empleando el programa LCS Lite 2.61 (Leica Confocal Software; 2004). Posteriormente, se montaron en láminas con el programa Microsoft Office PowerPoint.

2.5. Técnicas estereológicas

La estereología es un conjunto de métodos simples que combina la probabilidad geométrica y la estadística para la cuantificación de características geométricas tridimensionales de objetos, como el volumen, área de superficie, longitud, número y conectividad.

2.5.1. Recuento celular: Densidad numérica

En el presente trabajo se ha realizado el recuento de poblaciones neuronales inmunomarcadas para SOM, NPY, PV, CR, Reelina y NeuN, en la corteza entorrinal de ratones transgénicos PS1xAPP, PS1 y controles WT de 2, 4, 6, 12 y 18 meses de edad, así como de la población NeuN-positiva en la capa V de la corteza motora (entre 2,46 hasta - 0,82 mm según las coordenadas de Bregman; atlas de Franklin y Paxinos (2008) de animales WT y PS1xAPP de 6 meses de edad, empleando la técnica estereológica del disector óptico, dado como densidad numérica (DN) en número de neuronas por volumen (células/mm³). El uso del disector óptico como un procedimiento de muestreo está considerado como el mejor método para una estimación precisa de la densidad numérica de células.

Para la aplicación de este método se empleó un sistema de computación interactivo que comprende un microscopio convencional (Olympus BX61), una cámara digital (Olympus DP71), el programa informático NewCAST (Computer Assisted Stereological Toolbox, Olympus) con el sistema VIS 2.61.1.0 (Visiopharm Integrator System, Visiopharm®) y un microcator (Prior ProScan), que monitoriza los movimientos del eje z con una resolución de 0,5 µm.

El programa informático NewCAST requiere que los objetos bajo investigación (en nuestro caso células inmunomarcadas) sean muestreados de manera uniforme, es decir, en un área determinada cada objeto debe tener la misma probabilidad de ser contado. Se delimita el área de la región a medir y se determina el porcentaje de la muestra que se quiere estudiar (entre el 20 y 50% del total) y el programa realiza un muestreo de la zona seleccionada al azar, en regiones equidistantes (el primer punto seleccionado es al azar y los consecutivos se marcan con una distancia preseleccionada), mediante el comando “meander sampling” o muestreo en forma de meandro. El área se selecciona manualmente con el objetivo de 4x ó 10x, dependiendo de la facilidad para delimitar la zona y el muestreo se realiza con el objetivo de 100x de inmersión. Para cada animal se midieron una media de 6-8 secciones seriadas en la corteza entorrinal, cada una separada por 280 µm (ya que se muestrea una fracción de 1/7 y los cortes tienen 40 µm de grosor), pertenecientes a un hemisferio cerebral, obteniendo así una representación global a lo largo del eje rostro-caudal (Fig. 2.7).

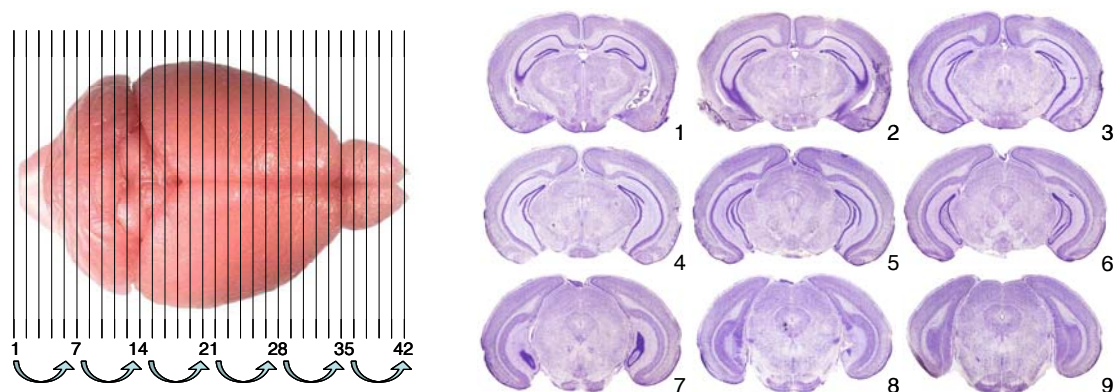


Figura. 2.7. Representación de las secciones coronales realizadas a lo largo del eje rostro-caudal. Para la cuantificación se muestrea una fracción de 1/7, cada sección esta separada de la siguiente por 280 μm (izq.). Se obtienen así múltiples secciones coronales seriadas válidas para la cuantificación estereológica, evitando sesgos (dcha.; Tomado del Atlas Paxino; 2008).

Para la estimación de la densidad numérica, el programa emplea cuadrículas o ventanas, denominadas “*counting frames*” o ventanas de conteo, con un área de 1874,2 μm^2 , en combinación con el método del disector óptico, que es un método de estimación del número de perfiles somáticos en un volumen de referencia de la muestra, que en este caso fue de 10 μm de grosor por el área de la ventana de conteo. Se delimitó un área de guarda de 3 μm por encima y por debajo del volumen de referencia. Las cuadrículas se distribuyeron de forma equidistante (69,45 μm), escaneando en este caso el 50% de la muestra. Teniendo en cuenta los límites de inclusión y exclusión de la cuadrícula, se realizó el conteo de aquellos somas inmunomarcados dentro del volumen seleccionado (Fig. 2.8).

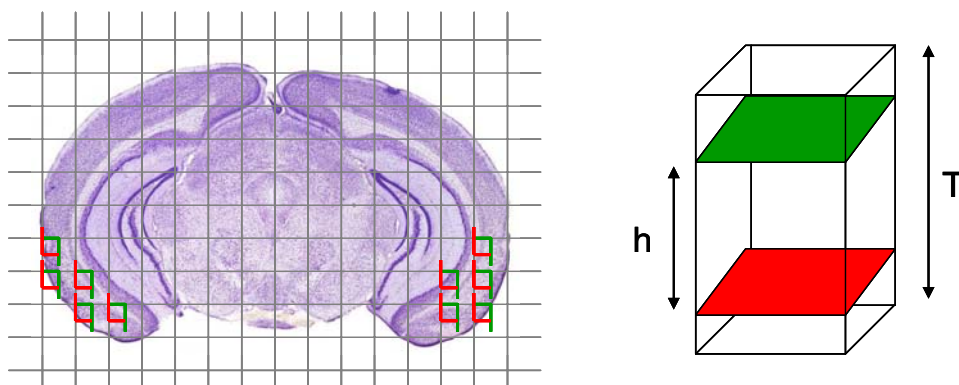


Figura 2.8. Esquema de la fracción del área muestreada y la fracción de la altura muestreada. En el muestreo sistemático, la cuantificación no se realiza en todo el tejido, sino que se cuenta el número de partículas que se encuentran contenidas en disectores ópticos que se hallan distribuidos sistemáticamente en una plantilla previamente diseñada, el 50% en el caso de la corteza entorrinal (Izq.). La fracción muestreada de altura, es la razón entre la altura de la ventana de conteo o disector óptico (h ; 10 μm en las muestras) y la altura total (T ; 40 μm de grosor inicial del tejido) de la sección de tejido (Dcha.).

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

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

donde Q es el número de somas; A es el sumatorio de las áreas, es decir, el área de la ventana de conteo ($1874,2 \mu\text{m}^2$) por el número de ventanas cuantificadas y h es la altura del disector ($10 \mu\text{m}$), resultando un volumen de referencia de $18742 \mu\text{m}^3$. Así, se obtiene la densidad numérica de cada una de las secciones de cada animal, se realiza su media y se muestran los resultados en células/mm³. Posteriormente, se realizó la media entre los animales de cada grupo de edad y genotipo y se presentó junto a la desviación estándar del grupo.

2.5.2. Estimación del volumen: Principio de Cavalieri

Para la estimación del volumen de una estructura, como puede ser el volumen de la corteza entorrinal o de una de sus capas, se empleó el método o principio de Cavalieri, mediante el método de recuento de puntos sobre las secciones del tejido. El principio de Cavalieri demuestra que dos figuras con la misma altura y en las que las secciones que cruzan poseen el mismo área, poseen a su vez el mismo volumen.

Se empleó la plantilla de puntos de forma aleatoria y se contabilizó el número de intersecciones que se dan entre la malla de puntos y el tejido. Para ello se ha empleado una media de 10 secciones de la corteza entorrinal para cada uno de los genotipos y edades analizadas. La fórmula empleada fue la siguiente:

$$\hat{V} = \bar{t} \cdot a(p) \cdot \sum_{i=1}^m P_i$$

donde V es el volumen de la muestra; t es la distancia media entre dos secciones contiguas (una media de $280 \mu\text{m}$ en nuestro caso); a(p) es el área asociada a cada punto y $\sum P_i$ es la suma de todos los puntos impactados. Para calcular el volumen de la corteza entorrinal completa se ha empleado una malla de puntos de 3x6, con un área asociada de $22689,5 \mu\text{m}^2$, mientras que para el cálculo del volumen de la capa I de la corteza, al ser menor, la malla fue de 4x8, con un área asociada de $7179,1 \mu\text{m}^2$.

Finalmente, se calculó el coeficiente de error (CE) del volumen (V) de cada muestra, menor que 0,1, mediante la siguiente fórmula:

$$CE(\hat{V}) = \frac{1}{\sum P_i} \cdot \sqrt{\frac{1}{12} \cdot (3A - 4B + C) + 0.0543 \cdot \frac{\bar{b}}{\sqrt{a}} \cdot \sqrt{n_s} \cdot \sum P_i}$$

donde $\sum P_i$ es el sumatorio del número de puntos de la malla impactados sobre el tejido; A es el sumatorio de $P_i \cdot P_i$; B es el sumatorio de $P_i \cdot P_{i+1}$; C es el sumatorio de $P_i \cdot P_{i+2}$; b es el perímetro; a es el área y n_s el número de secciones empleadas para la cuantificación.

2.5.3. Tamaño y densidad de placas

En la cuantificación del tamaño de las placas marcadas con Tioflavina S, se empleó el método estereológico. La medida de las placas se realizó en un 20% de la región a estudiar, empleando un tamaño de disector óptico de $7528,5 \mu\text{m}^2$ y el objetivo de 40x. El área se determinó empleando el nucleador (2D IUR, bidimensional isotropic uniform random), que permite estimar áreas de perfiles. Se trata de líneas radiales (5 en nuestro caso) que permiten determinar el centro y los límites de las placas, obteniéndose su área en μm^2 . Posteriormente, las placas se agruparon por categorías de tamaño y se representaron gráficamente.

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

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

donde Q es el número de placas marcadas con Tioflavina-S y A es el sumatorio de las áreas, es decir, el área de la ventana de conteo ($7528,5 \mu\text{m}^2$) por el número de ventanas cuantificadas. Así, se obtuvo el número de placas por área de cada sección del animal, se separaron por rango ($<200 \mu\text{m}^2$, $200-500 \mu\text{m}^2$, $500-2000 \mu\text{m}^2$ y $>2000 \mu\text{m}^2$) y se representó la media obtenida junto a la desviación estándar.

2.6. Carga amiloide: Análisis de imagen

Para la cuantificación de la carga amiloide, las secciones de corteza entorrinal lateral inmunomarcadas para el anticuerpo contra β -amiloide 6E10 (carga amiloide total, incluyendo intracelular y extracelular), fueron fotografiadas como se ha descrito en el apartado 2.4.1, con el objetivo de 4x, manteniendo la misma intensidad de luz y sin variar en este caso ni el brillo ni el contraste. Se analizaron una media de 6-7 secciones para cada animal PS1xAPP analizado, de cada una de las edades (2, 4, 6, 12 y 18 meses).

Las imágenes seleccionadas fueron calibradas en el programa Visilog 6.3 (Noesis) y se delimitó el área de interés a cuantificar. Esta imagen se binarizó determinando siempre el mismo umbral, establecido en 128 de un rango que oscila entre 0 y 255. Se realizó la suma del área seleccionada y la imagen que resultó de la binarización, obteniéndose una zona de punteado que corresponde a la zona inmunomarcada (Fig. 2.9). Para conocer el porcentaje de área inmunomarcada se realizó una relación entre el área inicial (100%) y la obtenida tras la binarización. Esta medida permite establecer comparaciones entre individuos.

Para la cuantificación del área ocupada por las placas amiloides (carga amiloide extracelular fibrilar) marcadas selectivamente con TS, se empleó el mismo procedimiento. A diferencia de la cuantificación de β -amiloide con 6E10, las imágenes de TS fueron tomadas

con el microscopio de epifluorescencia, pero el procesamiento se realizó de la misma manera.

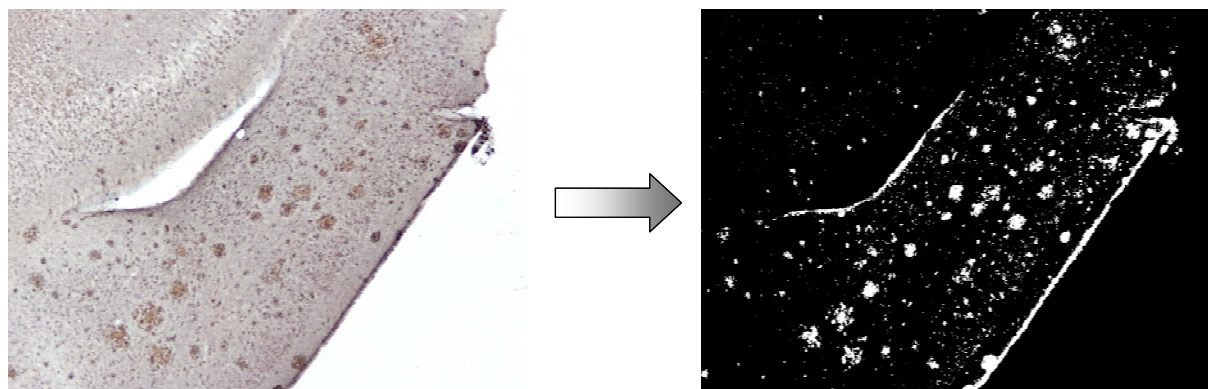


Figura 2.9. Proceso de binarización con el programa de análisis de imagen Visilog. En la imagen de la izquierda se puede observar la fotografía original sin procesar y, a la derecha, la misma imagen tras el proceso de binarización. El inmunomarcaje para el amiloide con el anticuerpo 6E10 (amiloide extracelular e intracelular) aparece como un punteado blanco.

2.7. Técnicas autorradiográficas

Las técnicas autorradiográficas permiten la localización de moléculas o macromoléculas en secciones de tejido gracias a su marcaje con un isótopo radioactivo. En este trabajo, hemos utilizado el radioligando ^3H -PK11195 específico de los receptores de benzodiazepina periféricos. Estos receptores se expresan en células gliales activadas en el sistema nervioso central y, por lo tanto, sirven como marcador de neuroinflamación.

2.7.1. Preparación del tejido

Ratones transgénicos PS1, PS1xAPP y animales control de 2 y 6 meses de edad ($n=4/\text{genotipo/edad}$), fueron decapitados y los cerebros extraídos y congelados rápidamente en isopentano (Sigma-Aldrich, I-9516) al 95% a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante unos 3 minutos. Los cerebros congelados fueron cortados en un criostato (CM1850; Leica Microsystems) a $-15/-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando el medio SAKURA Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound. Las secciones, con un grosor de $14\text{ }\mu\text{m}$, fueron adheridas sobre portaobjetos SuperFrost® (Menzel-Glaser) que se mantuvieron congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su utilización.

2.7.2. Unión del ligando

Las secciones, que se encontraban congeladas y sobre portaobjetos, se colocaron en un recipiente con hielo, se dejaron atemperar y se incubaron durante 1 hora a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en las soluciones de tratamiento. Para la unión total se usó el radioligando ^3H -PK11195 a una concentración de 18 nM y para la unión no específica se empleó ^3H -PK11195 18 nM + RO5-

4864 a 20 μM (apéndice 2.10.7). Tras esta incubación, se dieron dos lavados de 5 minutos cada uno en tampón Tris-NaCl (apéndice 2.10.7) a 4 °C y, a continuación, un lavado rápido en agua bidestilada a 4 °C. Los portaobjetos se dejaron secar al menos durante 4 horas y se prepararon para la adquisición de imagen.

2.7.3. Adquisición y procesamiento de imágenes

Los portaobjetos se limpiaron en la parte posterior con etanol de 70° y se colocó una lámina de cobre, que sirve de cátodo, colocándolos en la bandeja del adquisidor β -IMAGER™ 2000 de Biospace Mesures (París, Francia). El adquisidor (Fig. 2.10), toma imágenes de las radiaciones β emitidas por el tritio, ya que éstas ionizan la mezcla de gases que existen en el aparato (argón y trietilamina ó TEA). Las colisiones de los electrones en el gas generan una luz de centelleo que se recoge en una cámara de video, originándose la imagen.



Figura 2.10. Elementos principales e imágenes obtenidas por el adquisidor β -IMAGER™ 2000. El adquisidor, a la izquierda, posee una cámara de intensificación, donde se vierte el TEA, un detector de centelleo y una bandeja donde se carga la muestra. Al lado, se observa el ordenador de adquisición, que permite el control y la visualización a tiempo real de la adquisición, 500 veces más rápida que la exposición fotográfica. Las imágenes de la derecha son un ejemplo de la visualización directa en la pantalla del adquisidor.

Las imágenes que se obtuvieron se procesaron y cuantificaron con el programa β -VISION™+ de Biospace Mesures (París, Francia). Se pueden cuantificar tanto en escala de grises como de colores desde el azul al rojo, según la intensidad del marcaje. La cuantificación se realizó en cpm/mm^2 (curios por minuto por área). Así, se puede observar dónde se ha unido el ligando radioactivo y los niveles, en unidades relativas, de los sitios de unión ocupados por el ligando.

2.8. Técnicas moleculares

Para analizar los niveles de expresión del ARNm de los distintos marcadores de interés, se emplearon varias técnicas moleculares, como son la extracción y aislamiento del ARN, retrotranscripción a ADNc y cuantificación mediante PCR-real time, en muestras de la CE obtenidas mediante microdissección láser. Para este experimento se emplearon animales

WT, PS1 y PS1xAPP de 4 y 6 meses de edad, con un tamaño muestral de $n=4/\text{genotipo/edad}$.

2.8.1. Preparación del tejido

Los animales fueron anestesiados y decapitados rápidamente para evitar la degradación del ARN. Se extrajeron los cerebros y se congelaron rápidamente empleando isopentano, en condiciones de libre ARNasas, empleando un agente desnaturizante que inactiva la posible contaminación con ARNasas o ADNasas, que se pulveriza en la zona de trabajo y sobre los guantes. De este modo, los cerebros se pueden almacenar a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior procesamiento. Los cerebros congelados se cortaron en un criostato (CM3050s; Leica) en secciones coronales de $14\text{ }\mu\text{m}$ de grosor que se colocaron sobre portaobjetos SuperFrost® (Menzel-Glaser). Las secciones montadas sobre los portaobjetos también se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

2.8.2. Microdissección láser

En condiciones libre de ARNasas, se realizó la extracción de la corteza entorrinal lateral de las secciones mediante el microdisector Laser Pixcell II o LCM (*Laser Capture Microdisector*) y las cápsulas CapSure® HS LCM Caps (Arcturus Engineering).

Brevemente, las secciones se tiñeron con Hematoxilina (apéndice 2.10.8) para poder reconocer el área a diseccionar. Después, los portaobjetos se colocaron en el microdisector láser y sobre ellos se depositó una de las cápsulas mediante un brazo articulado. Empleando el objetivo de 10x del microscopio acoplado al microdisector, se realizó la selección del área a extraer (Fig. 2.11). Para el caso de la corteza entorrinal, se empleó un haz de $30\text{ }\mu\text{m}$ de diámetro de láser, con una potencia de 60 mV por 50 ms.

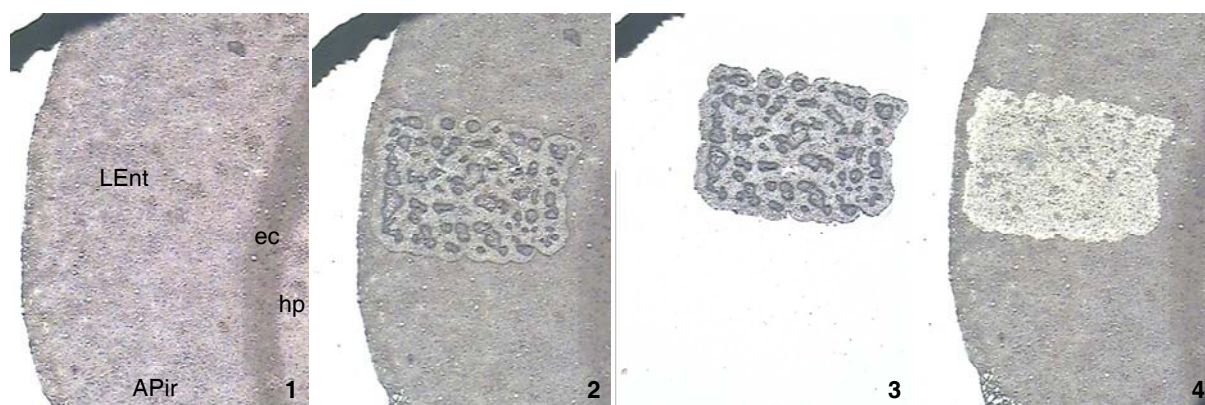


Figura 2.11. Imágenes de la microdissección láser sobre la corteza entorrinal lateral. Las secciones que contienen la corteza entorrinal se tiñeron ligeramente con hematoxilina (1) y, posteriormente, se aplicó el láser sobre la corteza entorrinal lateral (2). Un ejemplo de muestra microdisseccionada que se empleó en los estudios moleculares puede verse en la figura 3, mientras que en la 4 apreciamos la parte de la sección que desechamos. LEnt: corteza entorrinal lateral; APir: transición amigdalopiriforme; ec: cápsula externa; hp: hipocampo.

El pulso del láser incide sobre la cápsula colocada encima del tejido, provocando que la región del tejido sobre la que impacta el láser quede adherida a la cápsula (Fig. 2.11). En cada cápsula se colocaron varias secciones de corteza entorrinal de un mismo animal para aumentar la concentración final de ARNm extraído. Las muestras quedaron adheridas a la cápsula y se incubaron en una solución de extracción en un tubo de 0,5 mL con un volumen final de 10 μ L y se dejaron incubar a 42 °C durante 30 minutos. Finalmente, se centrifugaron a 800xg durante 2 minutos, proceso por el que el tejido quedó recogido en el tampón de extracción.

2.8.3. Extracción del ARN

En el proceso de extracción del ARN, se empleó el kit *"Pico Pure™ RNA Isolation"* (Kit-0214; Arcturus Engineering), según el protocolo predeterminado por el fabricante.

En primer lugar, se añadió tampón de acondicionamiento en la columna de purificación de ARN, incubando cinco minutos a temperatura ambiente, momento en el que centrifuga la columna durante un minuto a 16000xg. Posteriormente, se añadió etanol al 70% al extracto de células, sin centrifugar, y esto se incorporó a la columna de purificación. El ARN debe unirse a la columna y, para ello, se centrifugó a 100xg durante dos minutos e, inmediatamente, a 16000xg para que su unión se realice de forma uniforme a lo largo de la columna.

A continuación, se incorporó tampón de lavado y se volvió a centrifugar a 8000xg, seguido de un tratamiento con ADNasas (79254; Qiagen) para eliminar los posibles fragmentos de ADN que pudieran existir en la muestra. Se añadió a la columna un tampón que contenía ADNasa I y tampón RDD. Se dejó incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente y, posteriormente, se adicionó tampón de lavado, centrifugándose 15 segundos a 8000xg. Seguidamente, se realizaron dos lavados más y se centrifugó durante 2 minutos a 16000xg. La columna se transfirió a un nuevo tubo y se procedió a la elución, añadiendo el tampón de elución suministrado en el kit de extracción e incubando dos minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó el tubo a 16000xg durante un minuto, quedando el ARN en el líquido de elución, que posee un volumen final de 18 μ L. Estas muestras se pueden almacenar a -80 °C hasta el momento de su cuantificación.

2.8.4. Cuantificación del ARN

Para conocer la calidad y la cantidad del ARN que se ha extraído, se empleó el kit *"Agilent RNA 6000 Pico Assay"* (5067-1513; Agilent Technology), según las especificaciones de la empresa suministradora. Para este proceso se empleó un analizador, el Agilent 2100 Bioanalyzer, un chip (5065-4401, Agilent Technology) que se insertó en el analizador para conocer los parámetros que estamos buscando y un agitador específico denominado IKA vortex mixer de Agilent. El bioanalizar puede detectar la cantidad y la calidad del ARN presente en las muestras empleando únicamente 1 μ L de la solución de ARN y presenta los datos de calidad y cantidad como si se hubiera empleado un gel de electroforesis o un

electroferograma (gráfica en la que se representan por separado todos los componentes de una muestra), mostrando los valores de ARN 18s y 28s.

2.8.5. Retrotranscripción de ARN a ADNc

Las ARNasas poseen una alta afinidad por el ARN, por lo que es preferible transformar el ARN total en ADNc (ADN copia o complementario) que es más estable y permite su almacenamiento durante un largo periodo de tiempo, mediante la utilización de la enzima transcriptasa inversa, que genera el ADNc monocatenario teniendo como copia molde el ARN y manteniendo la misma proporción existente en la muestra o conversión cuantitativa.

Para realizar la retrotranscripción se empleó el kit “*High-Capacity cDNA Archive Kit*” (P/N 4322171; Applied Biosystems) que contiene los elementos que se muestran en la tabla 2.8.

Reactivo	Concentración	Volumen
Tampón RT	10x	10 µL
dNTP	25x	4 µL
Mezcla de cebadores	10x	10 µL
Enzima retrotranscriptasa	50 U/µL	5 µL

Tabla. 2.8. Reactivos que componen el kit “*High-Capacity cDNA Archive Kit*”. En la tabla se muestran los reactivos del kit, la concentración y el volumen al que se encuentran. Esta lista de reactivos se emplea para la conversión cuantitativa de ARN a ADNc.

En un tubo se añadieron las cantidades de reactivos que se muestran en la tabla 2.8, junto con la muestra que contiene el ARN y se llevaron a un volumen final de 50 µL empleando agua con DEPC (dietilpirocarbonato) a una concentración de 1/10.000 y pasada por el autoclave (libre de ARNasas) y se introdujeron en un termociclador (MasterCycler Gradient, Eppendorf; Hamburgo, Alemania). En un primer paso, se desnaturaliza el ARN elevando la temperatura a 65 °C durante 10 minutos para que quede de forma monohebra e inmediatamente después se pasa a 4 °C para evitar que se vuelva a renaturalizar. Posteriormente, se pasó a un programa de 10 minutos a 25 °C, seguido de 2 horas a 37 °C, que son las condiciones necesarias para que la enzima trabaje con una alta eficacia. Tras esta operación, el ARN ha pasado a ADNc y se puede congelar y almacenar durante un largo periodo de tiempo a -40 °C.

2.8.6. Reacción de la Polimerasa en Cadena

La reacción de la polimerasa en cadena o PCR permite la amplificación de fragmentos de ADN de forma específica gracias a la acción de la enzima polimerasa, que genera múltiples copias a partir de una cadena molde de forma exponencial, hasta

conseguir, tras varios ciclos de amplificación, una cantidad de ADNc detectable y cuantificable, proporcional a la cantidad inicial que había en origen.

La PCR puede ser a tiempo final o convencional o a tiempo real. En la primera, se produce la amplificación total del ADNc existente en el termociclador y, posteriormente, se cuantifica su cantidad mediante el empleo de geles de agarosa o electroforesis. En la segunda, se emplea un termociclador capaz de amplificar y cuantificar a la vez, ya que mide la fluorescencia que emite la muestra, que es proporcional a la cantidad de ADN existente; a mayor fluorescencia, mayor cantidad de ADN.

Para la realización tanto de la PCR convencional como para la PCR a tiempo real o RT-PCR, se emplearon los mismos tampones de reacción para evitar cambios en las condiciones de la polimerasa. Además, se utilizaron una de las siguientes sondas:

Sybr Green: Se une al surco menor de la doble cadena de ADN, emitiendo una fluorescencia detectable por el amplificador (no necesaria en la PCR convencional). Su principal característica es que su adherencia es aleatoria, ya que no se une específicamente a ninguna secuencia de ADN predeterminada, por lo que no requiere un diseño previo, pero puede generar productos inespecíficos como dímeros y trímeros de cebadores. Cuanto más ADN hay, más sonda unida a éste y mayor fluorescencia.

TaqMan: Esta sonda se une de forma específica a una secuencia interna del ADN. Posee un grupo fluorescente en el extremo 5' (no necesario para la PCR convencional) y una sustancia que absorbe la fluorescencia en el extremo 3' denominado *quencher* o silenciador. Cuando la sonda está intacta no se detecta fluorescencia, ya que está siendo absorbida por el silenciador, mientras que si actúa la polimerasa, la sonda se desprende y el fluoróforo está lejos del silenciador, por lo que entonces comienza a emitir fluorescencia.

2.8.6.1. Preamplificación con PCR convencional

Debido a que las muestras obtenidas mediante microdissección láser poseen una cantidad pequeña de ARN, en comparación con muestras obtenidas de una disección macroscópica, se debe realizar una amplificación previa a la cuantificación mediante PCR a tiempo real, para aumentar de forma proporcional la cantidad de ARN a cuantificar. Para ello, se realizó una preamplificación mediante PCR convencional, empleando los reactivos *FastStart SYBR Green Master (Rox)* (04-673-522-001, Roche Diagnostics) o *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (4304437, Roche Molecular Systems Inc.) como se muestra en la tabla 2.9.

Una vez realizada la mezcla de reacción, las muestras se pasaron al termociclador, según la siguiente programación de ciclos (Tabla 2.10). La temperatura de anillamiento es de 105 °C. Finalmente, se programó un paso de 4 °C par mantener conservadas las muestras en el termociclador hasta almacenarlas.

Reactivo	Volumen (μL)	Reactivo	Volumen (μL)
Sybr Green	10	Tampón TaqMan 2x	10
Cebador <i>up</i>	0,6 (300 nM)	Sonda específica 20x	1
	1,2 (600 nM)		
Cebador <i>lo</i>	0,6 (300 nM)		
	1,2 (600 nM)		
ADNc	1 ó 5	ADNc	1 ó 5
H ₂ O _d	Hasta 20 μL	H ₂ O _d	Hasta 20 μL

Tabla. 2.9. Reactivos empleados para la PCR a tiempo final y a tiempo real. Estos reactivos se emplean para ambos tipos de PCR, para evitar cambios iónicos en el ambiente de la polimerasa. Para la PCR a tiempo final se emplea 1 μL de ADNc, mientras que para la PCR a tiempo real se emplean 5 μL.

En la preamplificación se aumenta la cantidad del ARN que se quiere cuantificar específicamente. Algunos marcadores a detectar están, en condiciones fisiológicas normales, menos expresados que otros, por lo que el número los ciclos de amplificación, que determina el número de veces que actúa la polimerasa, varía según el marcador. Así, para los más representados se realizan cinco ciclos de amplificación (uno inicial y cuatro repeticiones) y para los más minoritarios, se programan diez ciclos (uno inicial y nueve repeticiones) (Tabla 2.10).

Temperatura	Tiempo		Temperatura	Tiempo
94 °C	4 minutos	4x	94 °C	4 minutos
94 °C	40 segundos		94 °C	40 segundos
60 °C	40 segundos		60 °C	40 segundos
72 °C	40 segundos		72 °C	40 segundos
72 °C	5 minutos		72 °C	5 minutos

Tabla 2.10. Etapas de la PCR a tiempo final. Comprende los periodos de desnaturalización, elongación y amplificación. Dependiendo de la abundancia del marcador a cuantificar, las muestras se amplificaron 5 ó 10 ciclos, ya que las muestras para marcadores más abundantes requerían un menor número de ciclos de preamplificación y viceversa.

En la tabla 2.11, se recogen los marcadores que se han analizado a nivel de ARNm en las muestras microdisseccionadas por láser de corteza entorrinal.

Marcadores	Característica
β-actina	Es una isoforma de la actina. Es la proteína eucariota más conservada y aparece en todos los tipos celulares. Se utiliza como control endógeno o “housekeeper”.
COX2	Ciclo-oxigenasa 2. Se trata de una enzima inducible por citoquinas. Aunque su principal función es la síntesis de prostaglandinas, interviene en la regulación de la respuesta inmune.
Drebrina	Proteína de desarrollo y regulación cerebral (<i>developmentally-regulated brain protein</i>). Es una proteína de unión a F-actina y pertenece a la familia de los factores de despolimerización de la actina (ADF). Se emplea como marcador dendrítico por su abundancia en las dendritas neuronales.
DR5	Receptor capaz de activar la vía apoptótica al unirse con un ligando similar a TNF, denominado TRAIL ó Apo-2L. Pertenece al grupo de receptores que contienen un dominio de muerte.

Fas	También denominado CD95 ó Apo-1. Es uno de los receptores implicados en el desencadenamiento de la cascada apoptótica, ya que posee un dominio de muerte. Se activa por la unión a su ligando específico denominado FasL.
FasL	Ligando del receptor de muerte Fas. Pertenece a la superfamilia del TNF. Puede desencadenar la apoptosis tanto por vía de las caspasas como por una vía independiente.
Fractalquina	Quimioquina, también denominada CX3CL1. Posee funciones adhesivas y quimioatrayentes para la comunicación neurona-glía.
Lifeguard	Factor pro-supervivencia neuronal capaz de inhibir la apoptosis al bloquear al receptor de muerte Fas.
NOX1	NADPH oxidasa 1. Es un canal de protones dependiente de voltaje presente en los fagocitos residentes. Participa en la regulación del pH celular y en la generación de iones superóxido a partir del NADPH citoplasmático, generando especies reactivas del oxígeno y estrés oxidativo.
PSD95	Proteína de densidad post-sináptica 95. Es miembro de la familia de las guanilato quinasas asociadas a membrana (MAGUK), agrupándose en la membrana post-sináptica a los receptores NMDA, AMPA y canales de potasio.
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF (<i>TNF related apoptosis inducing ligand</i>). Es una proteína de membrana tipo II de la familia del TNF que se une a su receptor específico de muerte, enviando la señal de inicio de la apoptosis a través de caspasas.

Tabla. 2.11. Características de los marcadores empleados para la cuantificación de la expresión de ARNm mediante PCR. A la izquierda de la tabla se muestran las abreviaturas de algunas de las moléculas cuyo ARN ha sido cuantificado mediante PCR y, a la derecha, su importancia en el SNC.

La secuencia de cebadores empleados en la RT-PCR y las características de amplificación de cada marcador se muestran en las tablas 2.12 y 2.13, respectivamente.

Proteína	Cebador	Secuencia 5'→3'
β-actina	B-ACTup	AAGATCATTGCTCCTCCTGAGC
	B-ACTlo	AGCTCATCGTACTCCTGCTTGC
Bim	Bim up	CGAGTTCAACGAACTTACACAA
	Bim lo	GCGTAACAGTTGTAAGATAACCATTT
COX2	COX2 up	GCTCTTCCGAGCTGTGCT
	COX2 lo	GATTGGAACAGCAAGGATTTG
CR	Calretinina up	GCACTTTGATGCTGACGAAA
	Calretinina lo	TGGACATCATGCCAGAACCCT
Drebrina	Debrin up	AAGCTGTAAAAGTCAGGCC
	Debrin lo	AGTGCCAGCATTAGCAGCAG
Fas	FASup	AAACCAGACTTCTCATGCGATTCT
	FASlo	GGGTTCCATGTTACACGA
FasL	FASLup	CCGGTGGTATTTTTCATGGT
	FASLlo	AGGCTTTGGTTGGTGAAGCTC
GFAP	GFAPup	CTCCAACCTCCAGATCCGAG
	GFAPlo	TCTGACACGGATTTGGTGTCC
IGF1	IGF1up	AAGTCCCCGTCCCTACTGA
	IGF1lo	CCTTCTCCTTTGCAGCTTCGT
IGF1R	IGF1R up	GCAGCTGATGTGTACGTGCCT
	IGF1R lo	GGTGATCTTCTCTCGAGCTCACTC
iNOS	iNOSup	GGCAGCCTGTGAGACCTTTG
	iNOSlo	GGGATCTGAATGTGATGTTTGCT
MAC1	MAC1mmUP	TACATCAAGACTTCTCATGG
	MAC1mmLO	TTAGACCTCACATACGACTC
NPY	NPYmmUP	CATCAATCTCATCACCAGACAGA
	NPYmmLO	AAGGGTCTTCAAGCCTTGTTT

PV	PVmmLO	AAGAACCCGGATGAGGTGAAGA
	PVmmUP	ATTGTTTCTCCAGCATTTCAG
Sinaptofisina	SynaptommUP	AGACAGGCAGGTGAAGAGGA
	SynaptommLO	ACCCACTGCTCAAACCTCCAC
SOM	SOMmmUP	AGGATTTGCCCCAGGCAGCT
	SOMmmLO	TGCAGCCAGCTTTGCGTTCC
TNF α	TNFalfa up	ATGAGAAGTTCCCAAATGGCCT
	TNFalfa lo	GGGTCTGGGCCATAGAACTGA
VGAT	VGat up	GCTTCGTGCATTCACTCGAG
	VGat lo	CCCTAGTCCTCTGCGTTGGTT
VGluT1	VGlut1 lo	ACTGCACCCCAGCATCTC
	VGlut1 up	CCAGGGTGTGTTAACTTCGT

Tabla. 2.12. Secuencia de los cebadores empleados en la PCR a tiempo real. En esta tabla se muestra el marcador analizado, la denominación de los cebadores “up” y “low” y la secuencia específica empleada para la realización de la PCR a tiempo real.

Marcadores	Concentración cebador (nM)	ADNc	Ciclos	Dilución
β -actina	600	1 μ l	5 ciclos	1/1
Bim	300	1 μ l	5 ciclos	1/1
COX2	-	10 μ l	10 ciclos	1/1
CR	300	1 μ l	10 ciclos	1/1
Drebrina	300	5 μ l	10 ciclos	1/10
DR5	-	10 μ l	10 ciclos	1/1
Fas	300	1 μ l	5 ciclos	1/1
FasL	300	1 μ l	10 ciclos	1/1
FAIM _L	-	1 μ l	10 ciclos	1/1
Fractalquina	-	1 μ l	10 ciclos	1/1
GFAP	300	1 μ l	5 ciclos	1/1
IGF1	300	1 μ l	10 ciclos	1/1
iNOS	-	5 μ l	10 ciclos	1/1
Lifeguard	-	1 μ l	10 ciclos	1/1
MAC1 (CD11b)	300	1 μ l	5 ciclos	1/1
NOX1	300	1 μ l	10 ciclos	1/1
NPY	300	1 μ l	5 ciclos	1/10
PSD95	-	1 μ l	10 ciclos	1/1
PV	-	1 μ l	10 ciclos	1/1
Reelina	-	1 μ l	10 ciclos	1/1
Sinaptofisina	300	1 μ l	5 ciclos	1/10
SOM	300	1 μ l	5 ciclos	1/10
TNF α	-	1 μ l	10 ciclos	1/1
TNFR1	-	1 μ l	5 ciclos	1/1
TRAIL	-	1 μ l	10 ciclos	1/1
VGAT	300	5 μ l	5 ciclos	1/1
VGlut1	300	1 μ l	5 ciclos	1/1

Tabla. 2.13. Condiciones utilizadas para los marcadores empleados en PCR. En esta tabla se muestra la concentración del cebador empleado, la cantidad de muestra empleada, el número de ciclos de amplificación previa y la dilución utilizada en la PCR a tiempo real.

2.8.6.2. PCR a tiempo real

La PCR a tiempo real se realiza de forma similar a la PCR a tiempo final, ya que se usan los mismos reactivos en las mismas concentraciones (Tabla 2.9). La diferencia es que las muestras a analizar en la PCR a tiempo real en este caso, están preamplificadas, en las cantidades, ciclos y diluciones que se muestran en la tabla anterior (2.13). Así pues, se realizó la mezcla de los distintos reactivos con las muestras preamplificadas de los distintos marcadores, con un volumen final de 20 μL y se introdujeron en la placa de lectura del detector (96-well reaction plate, P/N 4306737; ABI PRISM® Sequence Detection Systems 7000). Se cubrió la placa con una cobertura especial (Optical adhesive covers, P/N N801-0580; ABI PRISM®, Applied Biosystems) que permite la lectura de los pocillos y evita la contaminación entre muestras y se procedió a la amplificación a tiempo real en el amplificador y detector ABI PRISM® Sequence Detection Systems 7000 (Applied Biosystems) según la siguiente programación de ciclos (Fig. 2.12):

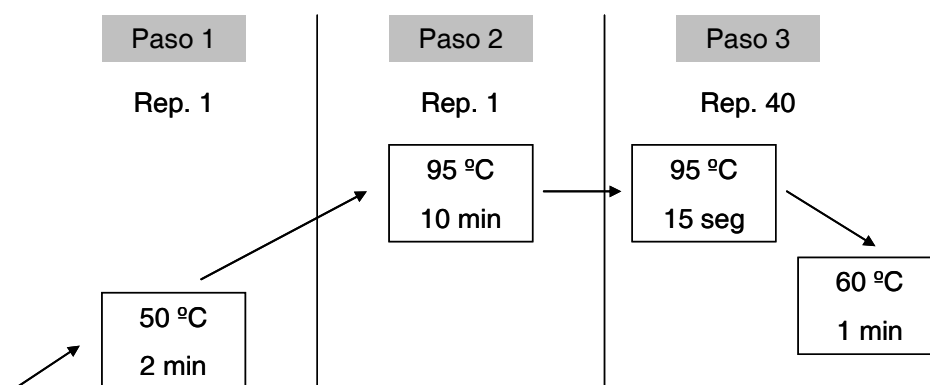


Figura 2.12. Etapas de la PCR a tiempo real. Comprende tres periodos distintos, el primero de desnaturalización, un segundo de elongación y el tercero de amplificación, que se repite en 40 ocasiones o ciclos de amplificación. En cada uno de ellos se obtiene una medida de la cuantificación de emisión fluorescente de cada muestra.

Por último, los resultados se procesaron mediante el programa específico ABI Prism 7000 SDS Software, que proporciona los valores de C_T de las muestras, punto en el que la fluorescencia alcanza un umbral a partir del cual el incremento en la cantidad de ADN amplificado es exponencial (Fig. 2.13).

Para las muestras en las que se emplean cebadores en lugar de sondas, se puede introducir un último paso para verificar la especificidad de la amplificación, elevando la temperatura hasta 60 $^{\circ}\text{C}$ (temperatura de desnaturalización del ADN) durante 30 minutos. La obtención de una curva en campana con un único máximo certifica la correcta amplificación (Fig. 2.13). A continuación, los valores de C_T de cada marcador se normalizaron con los valores de C_T de β -actina y, finalmente, se estableció una relación entre los animales control y los transgénicos en unidades relativas, teniendo el control un valor de 1. Estas unidades relativas de los animales PS1xAPP se representaron en histogramas con el programa Sigma Plot 9.0 y se analizaron estadísticamente con el programa Sigma Stat-32 3.0.

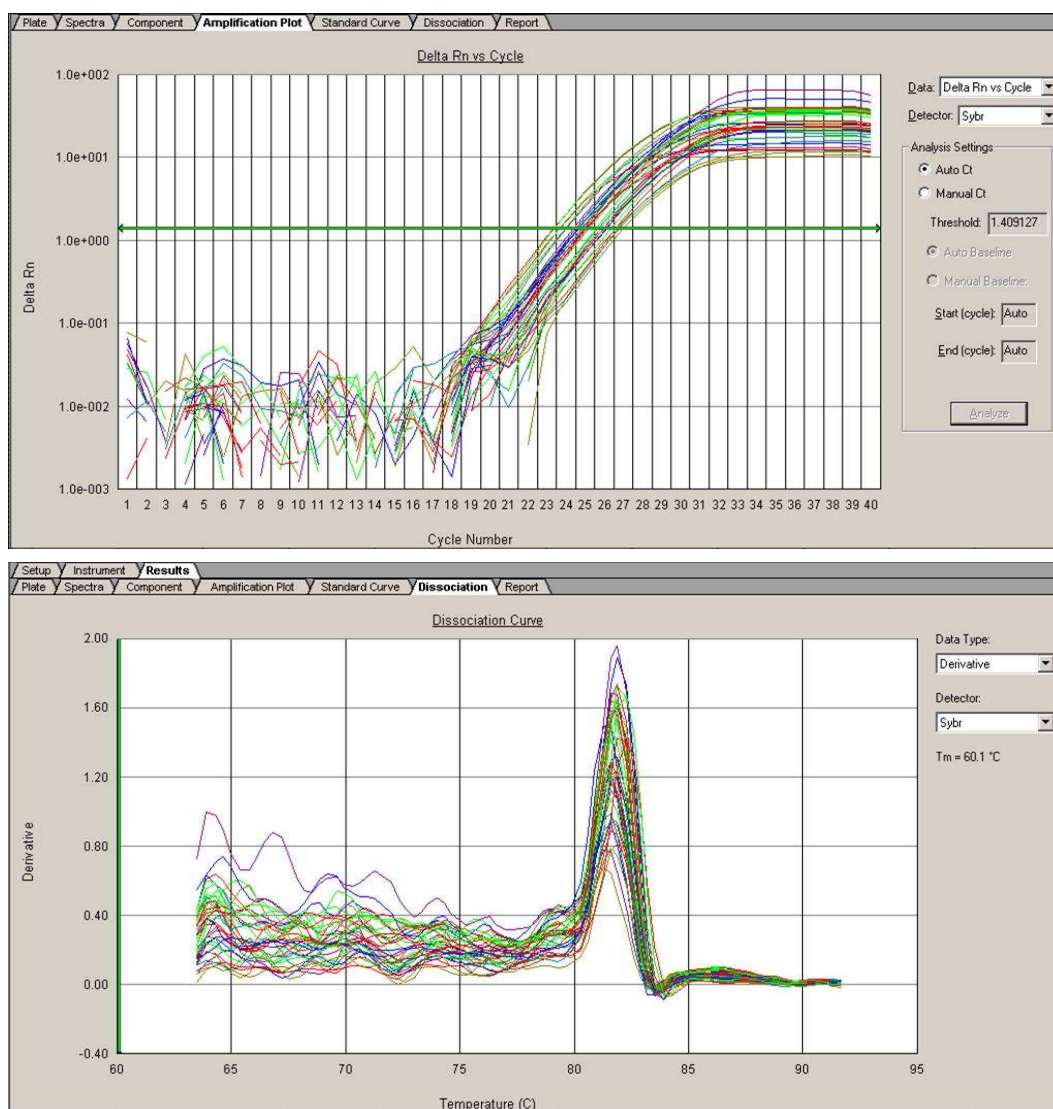


Figura 2.13. Imágenes del programa ABI Prism 7000 SDS Software. En la imagen de arriba, se observan las curvas de amplificación obtenidas en tiempo real de las muestras analizadas. La línea verde horizontal es el umbral que marca el valor de las C_T . En la imagen de abajo, se muestra la curva de disociación de un marcador amplificado con cebador, en este caso de la β -actina.

2.8.6.3. Electroforesis en gel de agarosa

Para comprobar que en el proceso de amplificación no se habían producido dímeros de cebadores, que la secuencia amplificada era la correcta y que existía una cantidad detectable, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

El gel de agarosa se realizó de la siguiente forma: en 230 mL de tampón TBE 10x (108 g/L de Tris; 54 g/L de ácido bórico; 40 mL/L de EDTA; pH 8) se añadieron 4,8 g de agarosa (AG-120; Ecogen) y se calentó a 60 °C para su completa disolución. Posteriormente, se añadieron 12 μ L de bromuro de etidio y se dejó enfriar en el molde (15-20 minutos) junto con los peines para realizar las calles.

Una vez en la cubeta de electroforesis que contiene tampón TBE 10x, se cargaron las muestras junto con tampón de carga (25 mg de azul de bromofenol, 1 mL de Tris 500

mM pH 7,4, 10 mL de glicerol al 87% y H₂O_d hasta 50 mL), que da densidad y color a la muestra, y un marcador de 100 pares de bases (10 ng/mL; Superladder-low 100 bp Ladder, GenSura Laboratories Inc.) como patrón, donde cada banda se distancia de la siguiente por 100 pb. Se cargaron 8 µL de patrón junto con 4 µL de tampón de carga, así como 10 µL de muestra y 5 µL de tampón de carga y se inició la electroforesis a un voltaje constante de 190 V. Finalmente, los geles fueron visualizados bajo luz ultravioleta y se fotografiaron con una cámara Polaroid®.

2.9. Análisis estadístico de datos

El análisis estadístico se realizó introduciendo los datos en el programa estadístico Sigma Stat32 3.0 (Advisory Statistics for Scientists), mediante el análisis de la varianza (ADEVA) de una o dos vías para estudiar las posibles diferencias entre la edad y/o el genotipo estudiado, seguida de los grados de libertad. Para las pruebas post-hoc se empleó la prueba de Tukey, ya que las varianzas eran homogéneas.

En el caso en los que fue imposible utilizar pruebas de comparaciones múltiples, se aplicó la prueba T de Student de dos colas (prueba bilateral con intervalo de confianza del 95-99%).

El nivel de significación en las pruebas es de $p < 0,050$, señalado con una estrella (*), $p < 0,010$ señalado con dos estrellas (**) o $p < 0,001$ señalado con tres (***).

2.10. Apéndice

2.10.1. Tampones para inmunohistoquímica

✓ Tampón fosfato (PB) 0,4 M pH 7,4

Dihidrógenofosfato sódico NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (1.06346, Merck)	13,8 g
Hidrógenofosfato disódico NaHPO ₄ ·2H ₂ O (1.06580, Merck)	53,4 g
H ₂ O desionizada	hasta 1000mL
Disolver, ajustar el pH a 7,4 con NaOH y enrasar.	

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

Cloruro sódico NaCl (131659, Panreac)	9 g
PB 0,4 M pH 7,4	250 mL
H ₂ O desionizada	hasta 1000 mL
Disolver, ajustar el pH a 7,4 con NaOH y enrasar.	

✓ Tampón citrato sódico 50 mM pH 6

Citrato sódico C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O (131655, Panreac)	1,47 g
H ₂ O desionizada	hasta 100 mL
Disolver, ajustar el pH a 6 con NaOH y enrasar.	

2.10.2. Solución fijadora

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

Paraformaldehído (CH ₂ O) _n (1.04005, Merck)	4 g
L-Lisina monoclóridato C ₆ H ₁₅ ClN ₂ O ₂ (1.05700, Merck)	1,37 g
Metaperyodato sódico INaO ₄ (1.06597, Merck)	0,21 g
PB 0,4 M, pH 7,4	50 mL
H ₂ O desionizada	hasta 100 mL

1. Disolver 4 g de paraformaldehído en 25 mL de agua desionizada previamente calentada a 60 °C. Añadir unas gotas de NaOH para su completa disolución.
2. Filtrar y completar 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 0,4 M pH 7,4.

2.10.3. Solución crioprotectora

- ✓ Solución de Sacarosa al 30%

Sacarosa C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ (131621, Panreac)	30 g
H ₂ O desionizada	hasta 100 mL

2.10.4. Portaobjetos gelatinizados

- ✓ Solución de Gelatina

Gelatina oro (251336, Panreac)	1 g
Alumbre de cromo KCr (SO ₄) ₂ ·12H ₂ O (141284, Panreac)	0,1 g
H ₂ O desionizada	200 mL

1. Disolver la gelatina en agua desionizada calentada a 60 °C.
2. Añadir el alumbre de cromo y diluir.

- ✓ Gelatinizado de los portaobjetos

1. Desengrasar los portaobjetos en una mezcla de alcohol absoluto:éter (1:1) durante al menos un día.
2. Secar los portaobjetos.
3. Sumergirlos en la solución de gelatina, preparada minutos antes, durante 15 segundos, dejar secar y sumergir de nuevo durante 15 segundos más en agitación.
4. Dejar secar en la estufa de 37 °C durante 24 horas. Los portaobjetos son viables durante al menos dos meses desde su preparación.

2.10.5. 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)	15 min.
Montaje con DPX	

2.10.6. Medio de montaje para inmunohistoquímica fluorescente✓ Medio DABCO (1,4-diazabicyclo [2.2.2.]-octano)

1. Preparar una mezcla PBS 0,1M pH 7,4 y glicerol (141339, Panreac) en una proporción 1:1.
2. Diluir DABCO al 3% (Sigma-Aldrich, D-2522) en la mezcla preparada.
3. Mantener la solución a 4 °C y en oscuridad.

2.10.7. Soluciones para autorradiografía✓ Tampón Tris-NaCl, pH 7,4, 4 °C

TRIZMA (concentración final 50 mM)	7,74 g
NaCl (concentración final 120 mM)	7,01 g
H ₂ O desionizada	hasta 1 L

✓ ³H-PK11195 18 nM ("Binding" total)

³ H-PK11195 11,98 µM, 1 mCi/mL en etanol	120 µL
Tampón Tris-NaCl	80 mL

✓ ³H-PK11195 18 nM + RO5-4864 20 µM ("Binding" no específico)

³ H-PK11195 18 nM	40 mL
RO5-4864 10 mM	80 µL
Para realizar este último reactivo a 10 mM, se emplean 5 mg de RO5-4864 en 1,56 mL de DMSO.	

2.10.8. Tinción para la microdissección láser (Hematoxilina de Mayer)

1. Etanol 75°	1 minuto
2. H ₂ O sin nucleasas (51200, AccuGene)	30 segundos
3. Hematoxilina de Mayer (H-3404, QS)	30 segundos
4. H ₂ O sin nucleasas	30 segundos
5. Solución Bluing (S5134, Sigma-Aldrich)	1 minuto

6. H ₂ O sin nucleasas	10 segundos
7. Etanol 75º	1 minuto
8. Etanol 95º	1 minuto
9. Etanol 100º (IB15720, VWR)	1 minuto
10. Xileno (x2)	1 minuto

3. Resultados

3.1. Vulnerabilidad neuronal en la corteza entorrinal del modelo PS1xAPP

La corteza entorrinal es, junto con el hipocampo, una de las principales regiones cerebrales que se ve afectada en la enfermedad de Alzheimer. En nuestro modelo animal PS1xAPP, la patología amiloide en la corteza entorrinal comienza a edades muy tempranas, observándose depósitos extracelulares de A β o placas amiloides desde los 3-4 meses de edad (Blanchard y col., 2003). Sin embargo, la vulnerabilidad neuronal en esta región cortical no ha sido estudiada con anterioridad en este modelo transgénico.

La corteza entorrinal consta de seis capas o láminas (I-VI), siendo I y IV capas plexiformes con escaso número de neuronas, mientras que las capas II, III, V y VI se consideran celulares por su gran densidad neuronal. Al igual que otras regiones corticales, las neuronas de la corteza entorrinal pueden clasificarse en dos tipos: neuronas de proyección o neuronas principales (glutamatérgicas) y neuronas locales o interneuronas (de naturaleza GABAérgica, principalmente). Las interneuronas, población heterogénea desde el punto de vista neuroquímico (ver introducción), representan el 15-30% del total de las neuronas corticales. En este trabajo hemos analizado la viabilidad de las neuronas principales y de las interneuronas de la corteza entorrinal y, concretamente, dentro de las interneuronas nos hemos centrado en las tres poblaciones mayoritarias: 1) población que expresa somatostatina y/o neuropéptido Y; 2) población que expresa parvalbúmina y 3) población que expresa calretinina.

Como primera aproximación, hemos analizado la existencia de cambios en la organización laminar/celular de la corteza entorrinal de los animales transgénicos PS1xAPP respecto a los animales WT y PS1 de la misma edad. Para ello, se ha empleado la tinción general de violeta de cresilo en secciones coronales de animales de 2, 6 (Fig. 3.1), 12 y 18 (Fig. 3.2) meses de edad. El estudio microscópico cualitativo de las secciones determinó que no existían diferencias apreciables ni en el patrón laminar ni en el grosor aparente de las capas entre los tres genotipos, desde los 2 hasta los 18 meses de edad. Sin embargo, a partir de 6 meses de edad, la densidad de núcleos neuronales en las capas profundas parecía menor en los doble transgénicos respecto a los WT y PS1 de la misma edad. Además, fue patente en los dobles transgénicos la aparición a partir de los 4 meses y, fundamentalmente, en capas profundas de estructuras de forma redonda u ovalada sin teñir, o ligeramente teñidas de color rosáceo, correspondientes a las placas amiloides y cuyo número aumentaba progresivamente con la edad. Numerosos núcleos gliales se concentraban alrededor de estas estructuras amiloides (flechas). La cantidad de núcleos gliales aumentaba de forma apreciable con la edad.

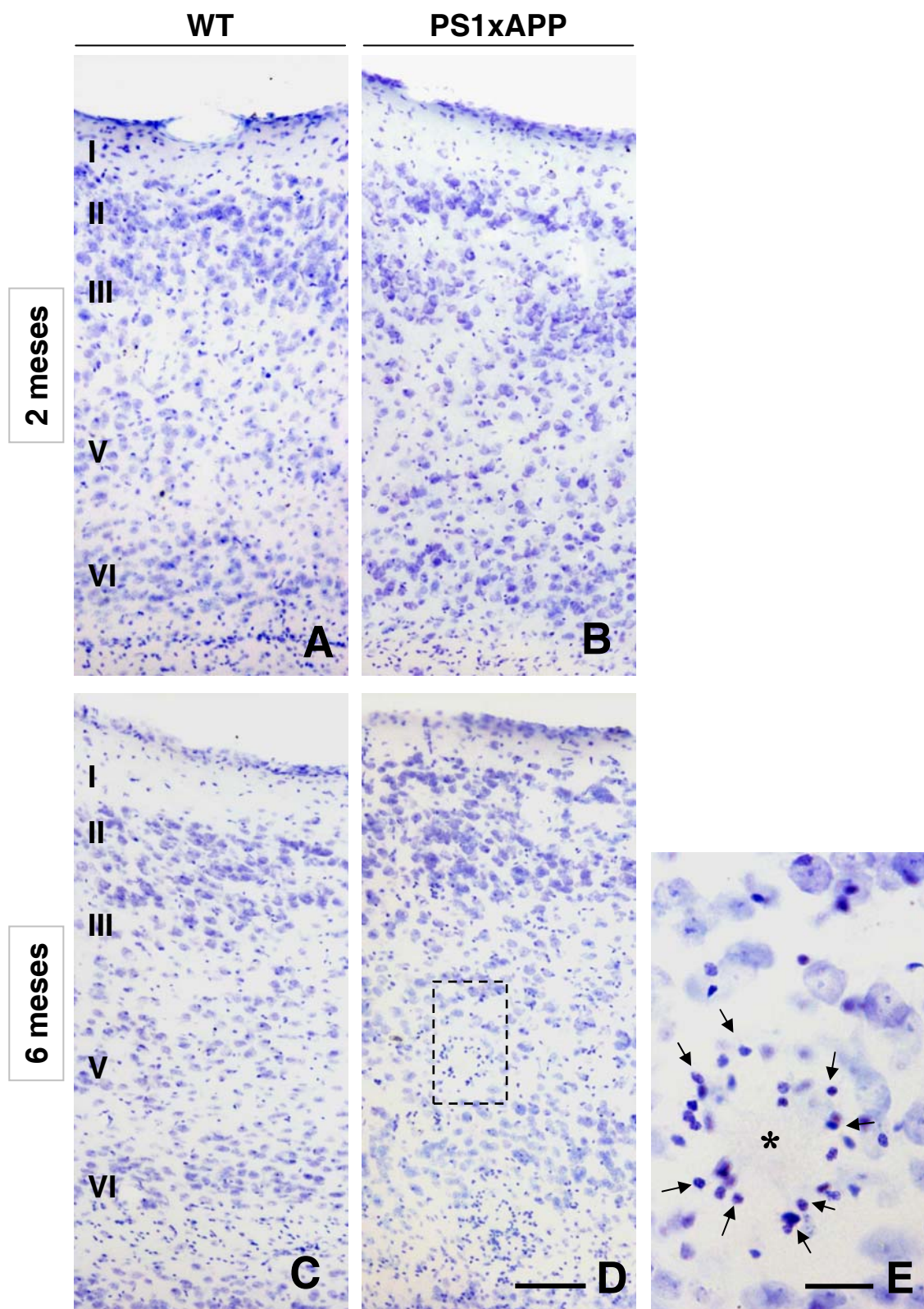


Figura 3.1. Organización laminar de la corteza entorrinal lateral a 2 y 6 meses de edad. Tinción de violeta de cresilo en secciones de animales WT (A y C) y PS1xAPP (B, D y E) a los 2 (A y B) y 6 (C, D y E) meses de edad. Se aprecia en ambos genotipos una laminación en la columna cortical en cuatro capas celulares (II, III, V y VI) y dos plexiformes (I y IV, ésta última no siempre visible). En los animales PS1xAPP de 6 meses se observa un incremento de células gliales (flechas), muchas de ellas localizadas alrededor de las placas amiloides (asterisco, ver detalle en E del recuadro en D). Barras de escala: 100 μ m (A-D); detalle (E): 25 μ m.

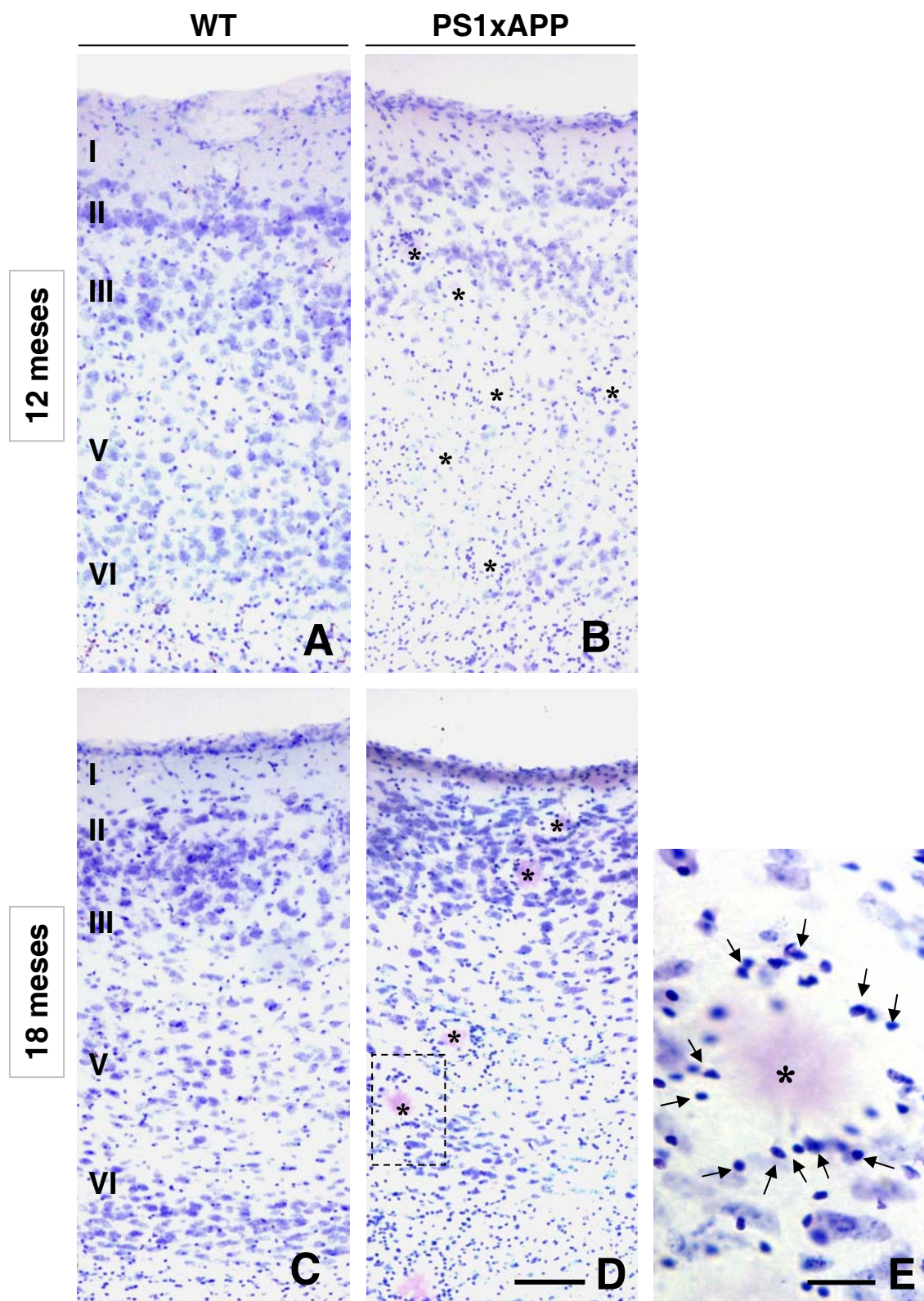


Figura 3.2. Organización laminar de la corteza entorrinal lateral a 12 y 18 meses. Tinción de violeta de cresilo en secciones de animales WT (A y C) y PS1xAPP (B, D y E) a los 12 (A y B) y 18 (C, D y E) meses de edad. La laminación de la columna cortical se mantiene con la edad en los animales de ambos genotipos. En los animales PS1xAPP de 12 y 18 meses existe una gran cantidad de células gliales (flechas) alrededor de las placas amiloides (asteriscos), sobre todo en las capas profundas, como se aprecia en el detalle (E) del recuadro de la imagen D. Una disminución de la densidad de núcleos neuronales en capas profundas también es patente en los doble transgénicos. Barras de escala: 100 μ m (A-D); detalle (E): 25 μ m.

3.1.1. Interneuronas GABAérgicas

3.1.1.1. Disminución selectiva de los niveles de ARNm para SOM en los animales PS1xAPP a los 6 meses de edad

Para determinar si en nuestro modelo PS1xAPP las interneuronas de la corteza entorrinal se encontraban afectadas desde estadios tempranos de la patología amiloidea (los depósitos de A β se detectan desde los 4 meses de edad), tal y como ocurre en el hipocampo (Ramos y col., 2006), se realizó en primer lugar un estudio cuantitativo mediante RT-PCR de la expresión del ARNm para marcadores moleculares específicos de las principales subpoblaciones de interneuronas (SOM, NPY, PV y CR) en muestras microdiseccionadas de animales PS1xAPP, PS1 y WT de 4 y 6 meses de edad, (Fig. 3.3). Los resultados de los animales WT y PS1 se analizaron conjuntamente y se representó la expresión del ARNm en unidades relativas en relación a los animales control, que poseen un valor relativo de 1.

Los resultados mostraron la existencia de una reducción significativa ($26,11 \pm 13,53\%$, Tukey $p < 0,01$, $n=4$) en los niveles de ARNm para el neuropéptido SOM en los animales PS1xAPP a los 6 meses de edad en comparación con los animales control de la misma edad. No se detectaron diferencias significativas en el doble transgénico para los marcadores NPY, PV ni CR a ninguna de las dos edades analizadas, aunque los valores obtenidos para CR mostraban tendencia a la disminución (en 3 de los 4 animales analizados), pero sin llegar estos valores a ser estadísticamente significativos. A los 4 meses no se detectaron cambios significativos en los niveles de SOM entre los distintos genotipos analizados.

3.1.1.2. Disminución significativa de la densidad de interneuronas SOM-positivas en los animales PS1xAPP a los 6 meses de edad

A continuación, se procedió a estudiar mediante técnicas inmunohistoquímicas el patrón temporal de expresión del neuropéptido SOM en la corteza entorrinal de animales WT, PS1 y PS1xAPP a los 2, 4, 6, 12 y 18 meses de edad y, posteriormente, se realizó el recuento de la población de interneuronas SOM-positivas mediante técnicas estereológicas.

En los animales control (Fig. 3.4 A y D), la distribución de las células SOM-positivas en la corteza entorrinal fue similar a la descrita por otros autores en cerebro de rata (Köhler y Chan Palay, 1983; Wouterlood y Pothuizen, 2000) y ratón (Markram y col., 2004; Canto y col., 2008). Dentro de esta población destacan las células de Martinotti, todas ellas caracterizadas por expresar SOM. Estas interneuronas se localizaban en las capas II, III, V y VI, siendo más abundantes en las capas profundas (V y VI) que en las superficiales (II y III). Dentro de las capas superficiales, la capa III presentaba la mayor densidad de células inmunorreactivas. La capa I, generalmente, no contenía células SOM-positivas, aunque, ocasionalmente, se podía observar algún soma inmunorreactivo en el límite con la capa II. A nivel morfológico, se distinguieron células de aspecto multipolar, las de mayor tamaño, con

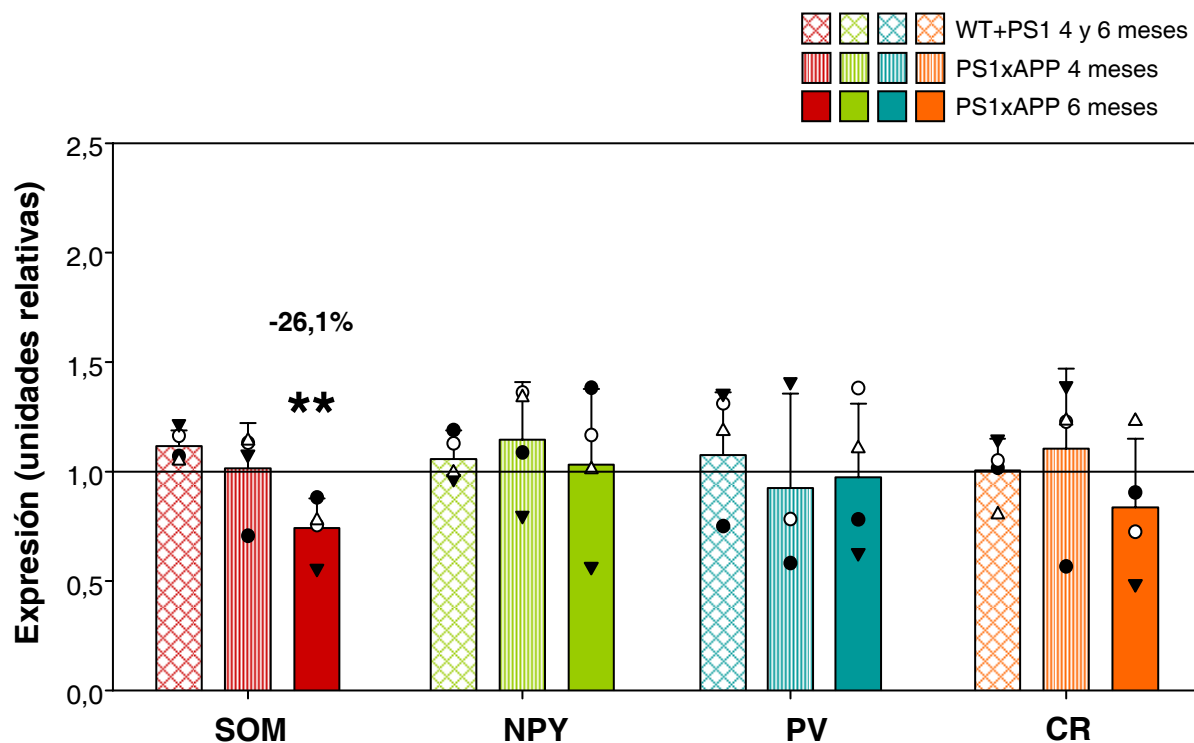


Figura 3.3. Niveles de expresión de los ARNm para los marcadores de las principales poblaciones de interneuronas (SOM, NPY, PV y CR). Estudio mediante RT-PCR en corteza entorrinal microdiseccionada con láser de animales transgénicos PS1xAPP a 4 y 6 meses de edad en comparación con los controles WT/PS1 de 4 y 6 meses. A los 6 meses de edad, existe una disminución significativa y selectiva en los niveles del ARNm de SOM en los animales PS1xAPP respecto a los controles (ADEVA de una vía, $F(2,10)=7,91$, $p<0,01$; Tukey $p<0,01$). No se detectan cambios para SOM a los 4 meses. Para los demás marcadores no existen diferencias significativas a los 4 ni a los 6 meses de edad. $n=4$; ** $p<0,01$.

diversas dendritas primarias inmunomarcadas, mientras que las células de menor tamaño mostraban un soma de aspecto ovalado o esférico con escasas dendritas inmunoteñidas. Los plexos axonales inmunorreactivos para SOM aparecían densamente marcados en las capas I, V y VI, mientras que el neuropilo de las capas II y III solía aparecer menos inmunoteñido.

A los 2 meses de edad (Fig. 3.4 A-C), no se observaron diferencias en cuanto a la distribución, morfología y número de interneuronas SOM-positivas entre los tres genotipos analizados. A los 4 meses (Fig. 3.4 D-F), aunque el marcaje para SOM fue similar en los animales transgénicos respecto a los controles, se pudo observar la presencia de neuritas distróficas inmunopositivas para SOM en los animales PS1xAPP. Estas neuritas aparecían hipertróficas con dilataciones aberrantes. A los 6 meses (Fig. 3.5 A-C), el número de neuritas distróficas en los animales doble transgénicos aumentó considerablemente, observándose, principalmente, en las capas profundas de la corteza entorrinal. A esta edad también se pudo observar en los animales PS1xAPP una disminución del número de interneuronas positivas para SOM, sobre todo en las capas profundas, lugar donde abunda esta población celular, aunque la tinción de fibras en el neuropilo no mostró cambios en su intensidad. A los 12 meses de edad (Fig. 3.5 D-F), la diferencia entre los animales control y los doble transgénicos fue aún más evidente, ya que, además de existir una menor densidad de células que expresan SOM, el neuropilo marcado presentaba zonas redondeadas completamente negativas para el marcaje, que con toda probabilidad se correspondían, por su forma y localización, con los depósitos de A β extracelular, como se verá más adelante. A edades muy avanzadas, 18 meses (Fig. 3.6), los animales PS1xAPP seguían presentando una reducción de somas inmunomarcados para SOM respecto a los animales WT y los PS1. Sin embargo, los animales WT y PS1 a 12 y 18 meses presentaban también un menor número de neuronas SOM-positivas que a edades más jóvenes (2, 4 y 6 meses), debido, probablemente, al efecto propio del proceso de envejecimiento.

La cuantificación estereológica de la población de neuronas SOM-positivas en la corteza entorrinal, expresada como densidad numérica en células/mm³ (Fig. 3.7 A), mostró una disminución significativa ($56,20 \pm 8,09\%$; Tukey $p < 0,001$) a los 6 meses de edad en los animales PS1xAPP en comparación con los animales control (WT y PS1) de la misma edad ($n=6$). Esta disminución fue del $44,92 \pm 30,01\%$ (Tukey, $p < 0,05$) a los 12 meses y del $53,08 \pm 12,86\%$ (Tukey, $p < 0,01$) a los 18 meses de edad. Los cambios a 6, 12 y 18 meses fueron muy similares, por lo que se puede decir que aproximadamente la mitad de la población de neuronas SOM-positivas se encontraba severamente afectada desde edades muy tempranas en este modelo de la EA. Sin embargo, la población resistente se mantuvo estable durante todo el proceso de envejecimiento, ya que con el avance de la edad no se produjo un aumento de la población afectada. El proceso de envejecimiento normal, como era de esperar, también afectaba a la viabilidad de esta población en los animales controles, de forma que los animales WT de 12 de edad sufrieron una disminución significativa del $37,62\%$ (Tukey, $p < 0,05$ en comparación con los animales de 2 meses del mismo genotipo. A los 18 meses, la reducción no fue significativa debido al aumento de la variabilidad en los animales WT a esta edad.

Para determinar si en los animales PS1xAPP existía una vulnerabilidad selectiva dependiente de la localización laminar en la columna cortical, se realizó un estudio cuantitativo mediante estereología de la población SOM-positiva en capas superficiales (I-III) y capas profundas (IV-VI) por separado a los 6 meses de edad en los animales WT y los doble transgénicos PS1xAPP. Los resultados revelaron que la disminución en la densidad celular de la población SOM-positiva en los PS1xAPP se produce de forma homogénea en capas superficiales y profundas, siendo del $51,51 \pm 17,30\%$ (T de Student, $p < 0,01$) en las capas superficiales y del $51,16 \pm 19,42\%$ (T de Student, $p < 0,001$) en las capas profundas de la corteza entorrinal lateral (Fig. 3.7 B). Por lo tanto, las interneuronas SOM-positivas se encontraban afectadas por igual independientemente de su localización en la columna entorrinal.

3.1.1.3. La disminución del número de interneuronas SOM-positivas se debe a un proceso neurodegenerativo temprano

Para determinar si la disminución en la densidad de interneuronas SOM-positivas en la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP de 6 meses de edad se debía a un cambio fenotípico (dejaban de expresar SOM) o a un proceso neurodegenerativo (muerte neuronal), se realizó un doble inmunomarcaje SOM/NeuN para microscopía de campo claro, utilizando para el revelado DAB/Níquel (color azul) en el caso del anticuerpo anti-SOM y sólo DAB (color marrón-anaranjado) en el caso del anticuerpo para NeuN (Fig. 3.8). De este modo, en marrón se podían observar los núcleos de todas la neuronas maduras, mientras que en azul se marcaba el citoplasma de las interneuronas SOM-positivas, que además presentaban el núcleo marcado con NeuN. De esta forma, mediante el empleo de técnicas estereológicas se pudo cuantificar la población total de neuronas (marcaje simple con NeuN) y, por otro lado, la población de interneuronas SOM-positivas (marcaje doble SOM-NeuN) en animales PS1xAPP, PS1 y WT de 6 meses de edad (Fig. 3.9).

El análisis microscópico de las secciones doblemente inmunoteñidas (Fig. 3.8), reveló una aparente disminución del número de interneuronas SOM-positivas en los transgénicos PS1xAPP respecto a los controles, tal y como habíamos visto anteriormente pero, además, se observó una disminución del número de neuronas marcadas sólo con NeuN en las capas profundas de la corteza entorrinal, en comparación con los animales WT y PS1 de la misma edad. En la Fig. 3.8 (D-F) se muestra a mayor detalle las capas profundas, donde se aprecia claramente la pérdida de neuronas marcadas con NeuN de los transgénicos PS1xAPP. La cuantificación estereológica de la densidad neuronal para la población SOM-positiva y la población NeuN-positiva se muestra en la Fig. 3.9. Los resultados determinaron que no existen diferencias significativas entre los animales PS1 y los WT a los 6 meses de edad, mientras que sí existía una disminución significativa a esta edad en los animales PS1xAPP para ambas poblaciones. El número de interneuronas SOM-positivas disminuye más de un 56%, al igual que habíamos determinado con anterioridad. Para la población marcada únicamente con NeuN (todas las neuronas), existe una disminución del $27,16 \pm 7,39\%$ (T de Student, $p < 0,05$). El cálculo de la diferencia entre el

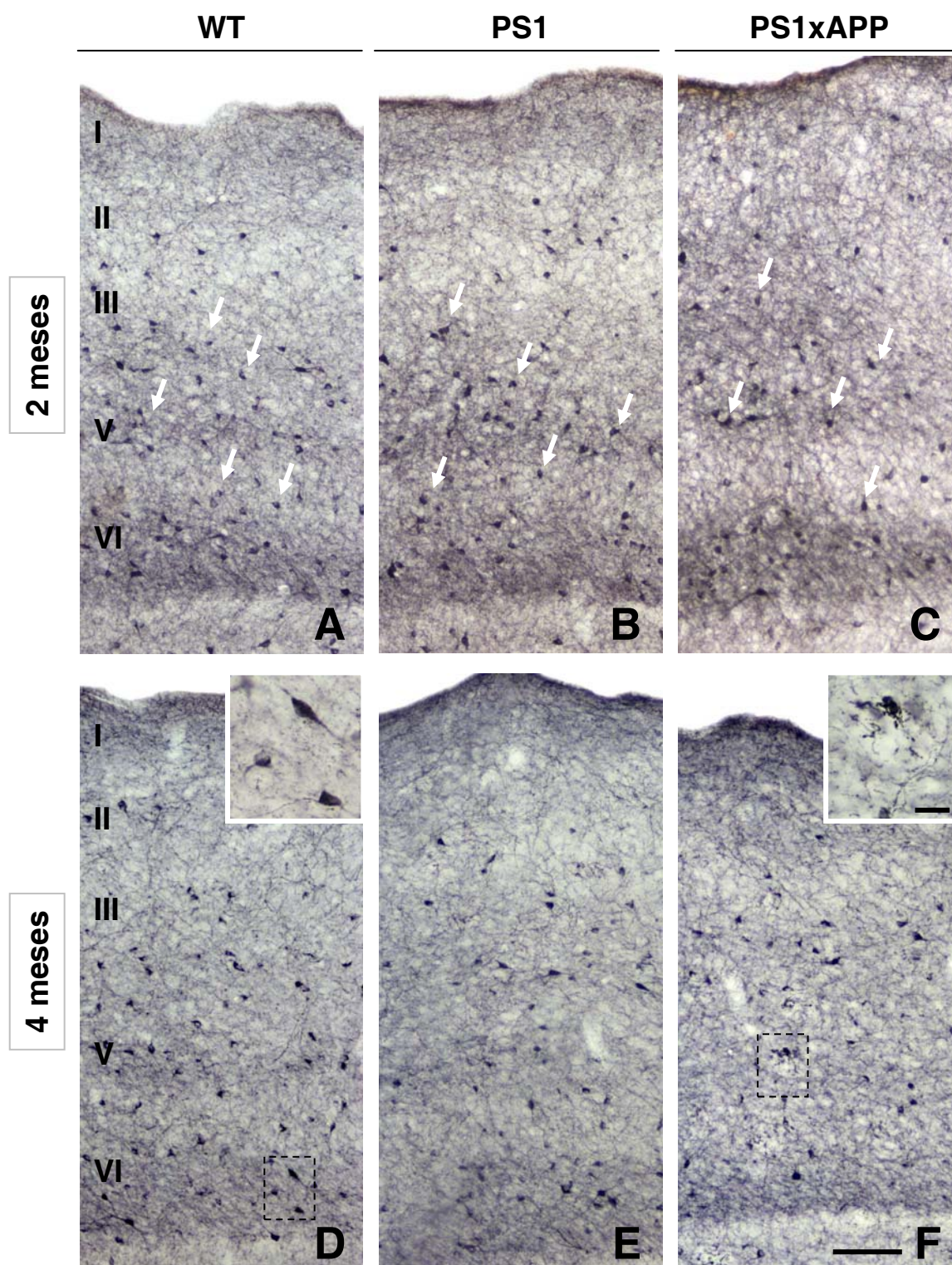


Figura 3.4. Inmunohistoquímica para células somatostatina en la corteza entorrinal lateral de animales WT (A y D), PS1 (B y E) y PS1xAPP (C y F) de 2 (A-C) y 4 (D-F) meses de edad. Las células SOM-positivas (flechas) se localizan a lo largo de las capas II-VI, con una distribución y morfología similar en los tres genotipos. La mayoría son células multipolares, con el soma y varias dendritas primarias inmunoteñidas (ver inserto en D). En los animales doble transgénicos PS1xAPP a los 4 meses de edad se observan neuritas distróficas para este marcador (ver inserto en F). Barras de escala: 100 μ m (A-F); insertos: 20 μ m.

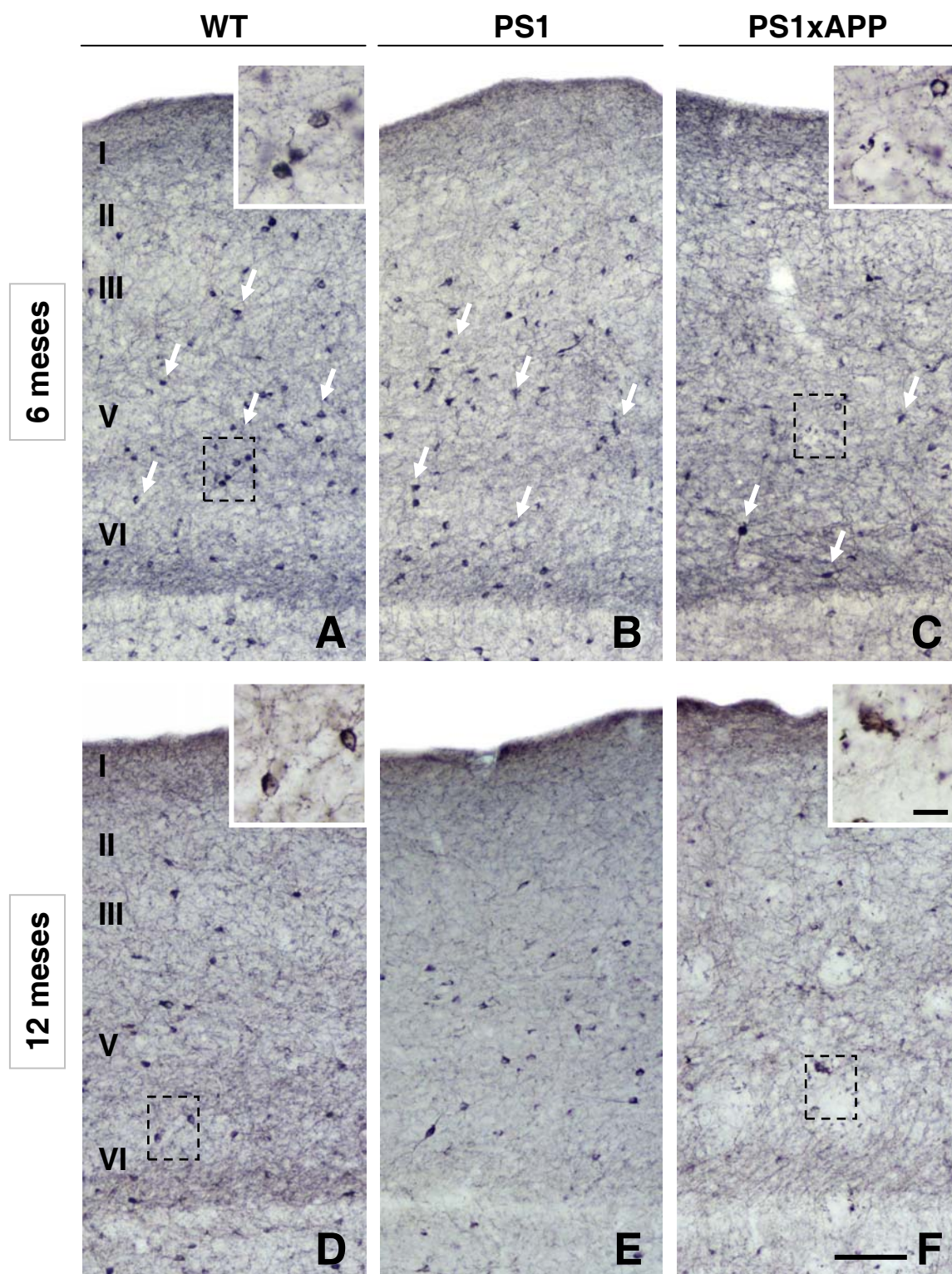


Figura 3.5. Inmunohistoquímica para células somatostatina en la corteza entorrinal lateral de animales WT (A y D), PS1 (B y E) y PS1xAPP (C y F) de 6 (A-C) y 12 (D-F) meses de edad. La distribución y morfología (inserto en A y D) de las células SOM-positivas (flechas) se mantiene en los tres genotipos. Sin embargo, el número de somas inmunorreactivos disminuye en el modelo PS1xAPP a los 6 meses respecto a los WT y PS1 y existe un aumento de las neuritas distróficas (inserto en C). A los 12 meses de edad, se aprecia una disminución de neuronas SOM-positivas en los tres genotipos, aunque siempre superior en los animales doble transgénicos. El inserto de F muestra neuritas distróficas de PS1xAPP. Barras de escala: 100 μ m (A-F); insertos: 20 μ m.

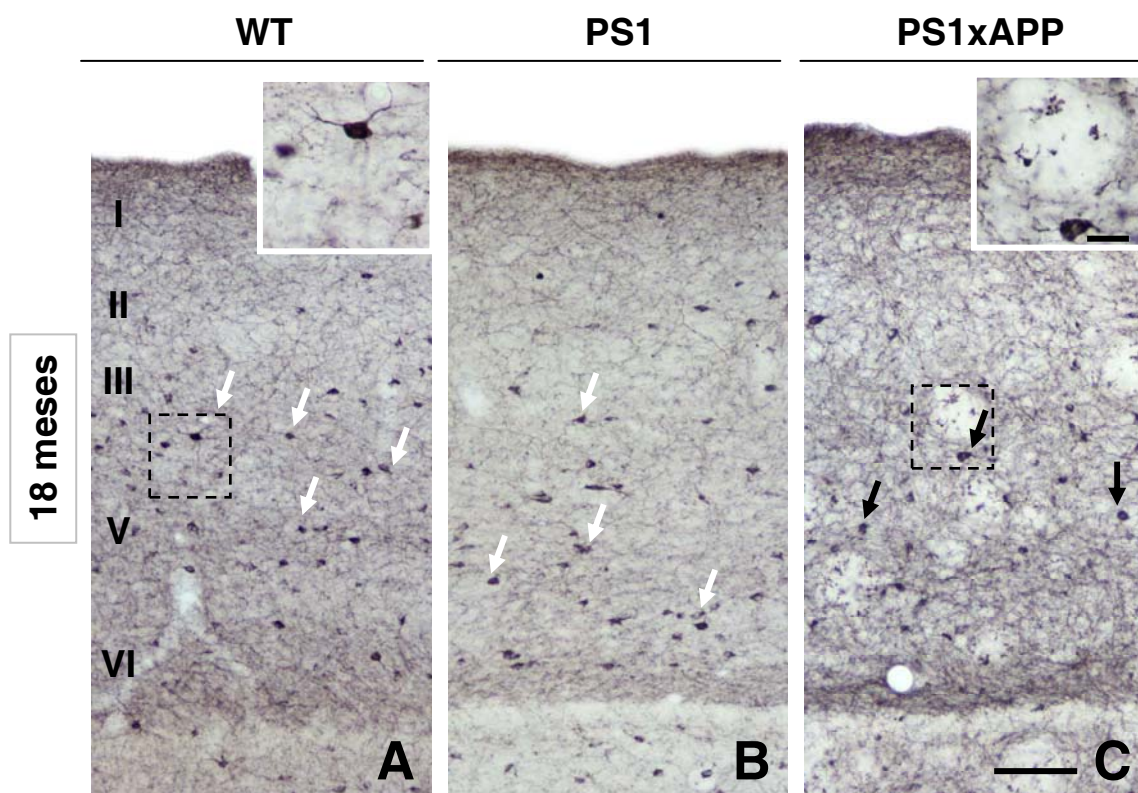


Figura 3.6. Inmunohistoquímica para células somatostatina en la corteza entorrinal lateral de animales WT (A), PS1 (B) y PS1xAPP (C) de 18 meses de edad. A esta edad, el número de interneuronas SOM-positivas está reducido en los tres genotipos respecto a edades más jóvenes (2-6 meses), siendo más aparente en los doble transgénicos. Además, existe una gran cantidad de neuritas distróficas a lo largo de toda la columna cortical asociadas a las placas amiloides en el modelo PS1xAPP, como se muestra en el inserto de la figura C. Barra de escala: 100 μm ; inserto: 20 μm .

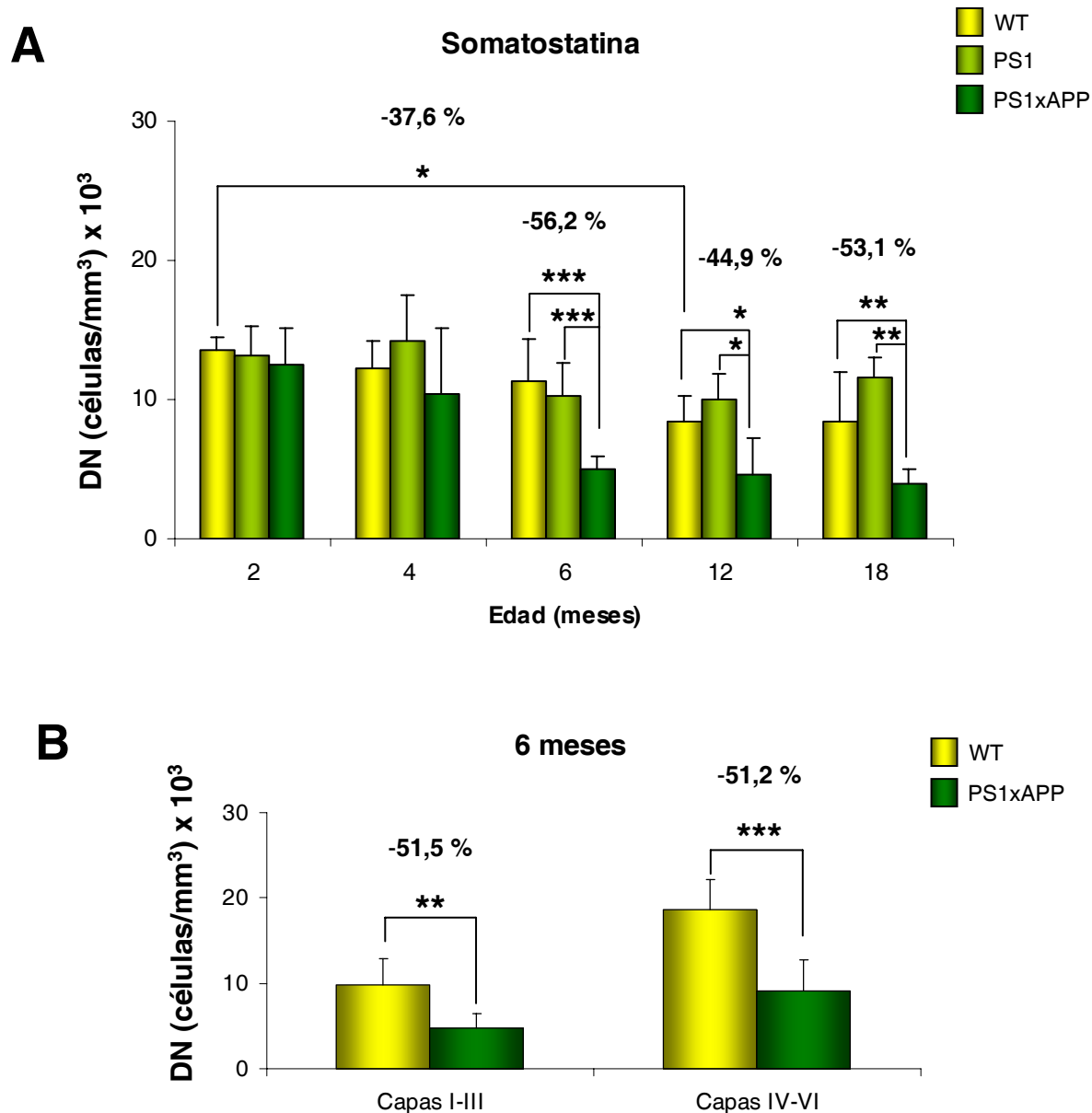


Figura 3.7. Recuento estereológico de la población de interneuronas SOM-positivas en la corteza entorrinal. A) estudio en animales WT, PS1 y PS1xAPP desde los 2 a los 18 meses de edad y B) estudio en capas superficiales (I-III) y profundas (IV-VI) en WT y PS1xAPP a los 6 meses. La densidad numérica (células/mm³) de interneuronas SOM-positivas disminuye de forma notable a los 6 meses edad en los animales PS1xAPP respecto a los WT y PS1 de la misma edad. Esta disminución se mantiene aproximadamente en la misma proporción a los 12 y 18 meses. La disminución de células SOM-positivas no es dependiente de su localización laminar, ya que la reducción es homogénea en capas superficiales (I-III) y profundas (IV-VI). n=6, ADEVA de una vía, F(14, 40)=5,70; p<0,001; Tukey (A). T de Student (B). * p< 0,05; ** p< 0,01; *** p< 0,001.

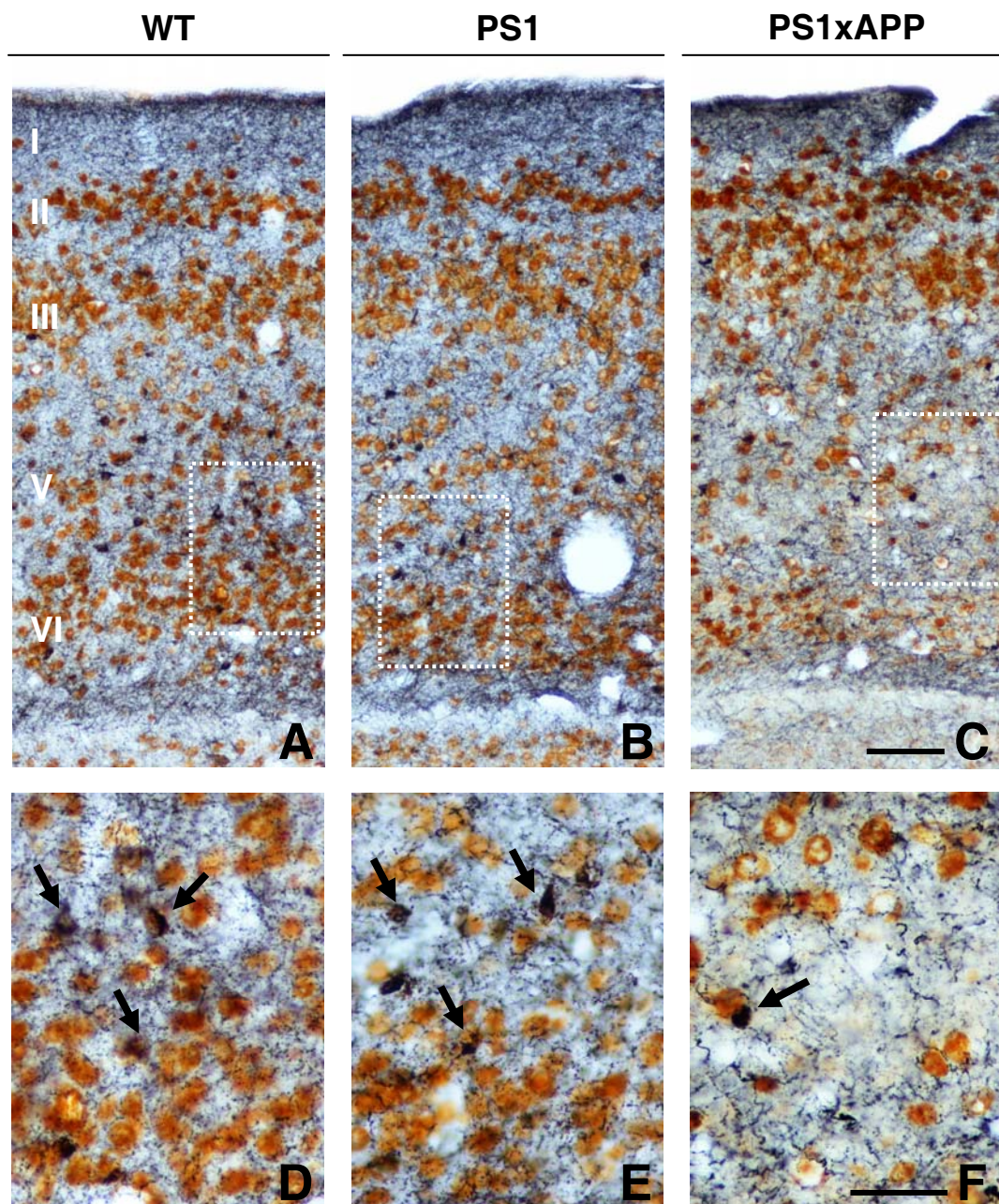


Figura 3.8. Doble marcaje inmunohistoquímico para SOM (azul) y NeuN (marrón) en la corteza entorrinal de animales WT (A y D), PS1 (B y E) y PS1xAPP (C y F) de 6 meses de edad. Los animales PS1xAPP muestran una marcada disminución del número de neuronas NeuN-positivas en las capas profundas de la corteza entorrinal lateral (IV-VI), hecho que no parece ocurrir en las capas superficiales. En las imágenes a mayores aumentos de capas profundas (D-F), se aprecia claramente la disminución de neuronas NeuN-positivas, así como de neuronas SOM-positivas (flechas) en los PS1xAPP respecto a los WT y PS1 de la misma edad. Barras de escala: 100 μ m (A-C); 50 μ m (D-F).

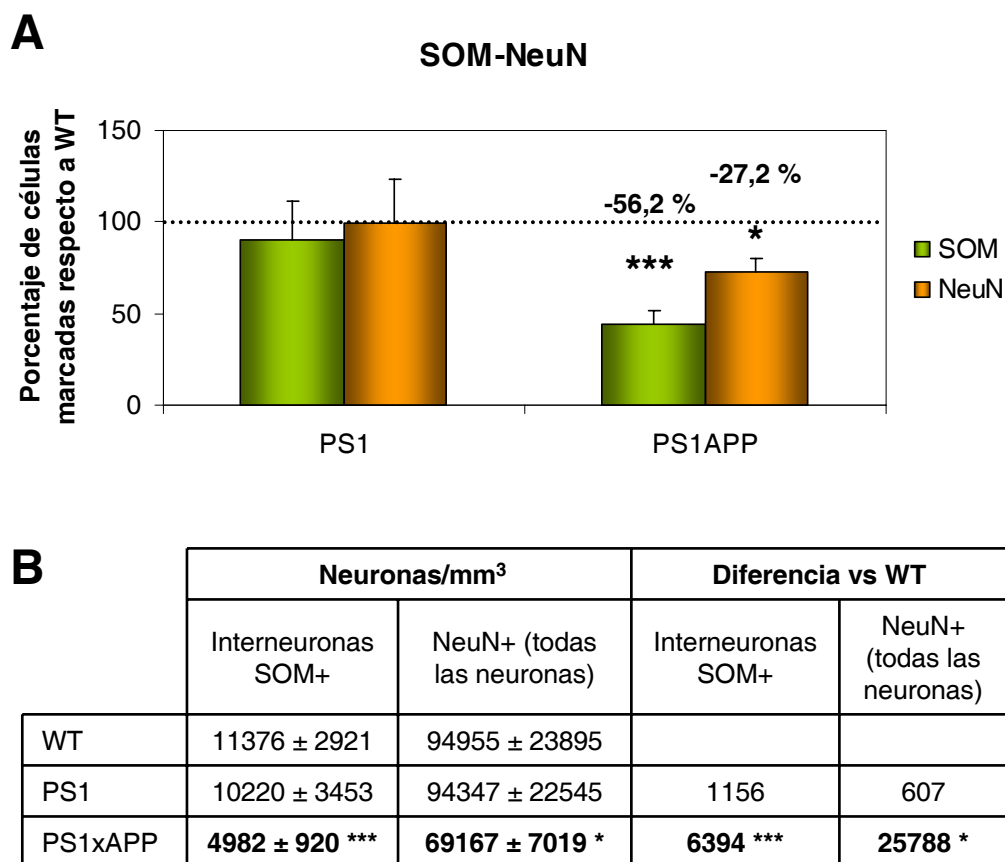


Figura 3.9. Recuento estereológico de la población de interneuronas SOM-positivas y de la población NeuN-positiva (neuronas en general) en las mismas secciones de corteza entorrinal de animales WT, PS1 y PS1xAPP de 6 meses de edad. Para el estudio cuantitativo se usaron secciones con doble marcaje inmunohistoquímico para SOM y NeuN. **A)** En esta gráfica puede apreciarse que en los animales PS1xAPP de 6 meses de edad existe una disminución significativa de la población de interneuronas SOM-positivas, así como de la población general de neuronas (marcadas con NeuN) en comparación con los animales WT, mientras que no existen cambios en los PS1. **B)** En esta tabla se detallan los datos de densidad numérica para ambas poblaciones junto con su desviación estándar. El análisis de la diferencia entre PS1xAPP y WT revela una pérdida neuronal en general (25788 neuronas/mm³), mucho mayor que la pérdida de interneuronas SOM+ (6394 neuronas/mm³) en los animales PS1xAPP. Estos datos indican que deben existir otros subtipos neuronales (otras interneuronas y/o neuronas principales) que sufren neurodegeneración a esta edad temprana. n=6, T de Student. * p<0,05; *** p<0,001.

número de neuronas presentes en los WT y los PS1xAPP, revela que el número de neuronas SOM-positivas que se pierde en los animales PS1xAPP es de 6394 neuronas/mm³, mientras que el número de neuronas en general (NeuN-positivas) que desaparecen es de 25788/mm³ (Fig. 3.9 B). Estos datos indican que la disminución de interneuronas SOM-positivas podría deberse a un proceso neurodegenerativo y no a un proceso de cambio fenotípico (hipofuncionalidad). La disminución de neuronas NeuN-positivas es claramente superior a la disminución de neuronas SOM-positivas, por lo tanto, además de la pérdida de esta población en particular, deben existir otras subpoblaciones neuronales (interneuronas y/o células principales) que se vean afectadas a la edad de 6 meses en los animales PS1xAPP.

3.1.1.4. La población de interneuronas NPY-positivas es también muy vulnerable a edades tempranas en el modelo PS1xAPP

En el hipocampo de este modelo animal, la subpoblación de células SOM-positivas más afectada fue aquella que co-expresaba NPY (Ramos et al., 2006). Aunque el número de interneuronas que expresan NPY es mucho menor que el que expresa SOM en la corteza temporal humana (Gonzalez-Albo y col., 2001) y en la corteza de ratón (un 8% frente a un 23%, respectivamente; Gonchar y col., 2008), también existe co-localización de estos dos neuropéptidos en determinadas subpoblaciones. En concreto, las interneuronas NPY-positivas suelen co-expresar en un alto porcentaje (más de la mitad) el neuropéptido SOM (Gonchar y col., 2008). De hecho, en la corteza prefrontal murina el 71-90% de las interneuronas NPY-positivas co-expresan SOM, mientras que las interneuronas SOM-positivas co-expresan en un 30% NPY (Kawaguchi y Kubota, 1997). Por lo tanto, se decidió analizar la población de interneuronas que expresan NPY en la corteza entorrinal de nuestro modelo transgénico en función de la edad.

Los somas NPY-positivos se encontraron distribuidos entre las capas III y VI, con una mayor concentración en las capas profundas de la corteza entorrinal, aunque, en ocasiones, aparecieron algunos somas inmunomarcados en la capa II, de forma similar a lo descrito por otros autores (Markram y col., 2004; Canto y col., 2008). El número de somas NPY-positivos en la corteza entorrinal fue mucho menor que el de somas SOM-positivos (comparar Fig. 3.10 y Fig. 3.4). Estos somas presentaban una morfología ovalada o esférica de tipo multipolar. Un plexo de fibras fuertemente inmunorreactivo para NPY aparecía distribuido de forma homogénea a lo largo de toda la columna cortical.

El análisis inmunohistoquímico puso de manifiesto que no existían diferencias significativas apreciables a 2 meses de edad en cuanto a la morfología, distribución y densidad de las interneuronas NPY-positivas entre los diferentes genotipos analizados (Fig. 3.10 A-C). Sin embargo, a los 4 meses de edad (Fig. 3.10 D-F), comenzaron a aparecer las primeras neuritas distróficas inmunopositivas para NPY en los animales doble transgénicos, principalmente en las capas profundas de la corteza entorrinal (ver inserto en F), aunque la distribución, morfología y densidad de las células no manifestaban cambios aparentes entre los distintos genotipos. A la edad de 6 meses (Fig. 3.11 A-C), comenzaron a apreciarse

zonas no inmunomarcadas de aspecto ovalado que, posiblemente, se correspondían con los depósitos extracelulares de A β . El número de neuritas distróficas aumentó considerablemente, siendo además muy prominentes en cuanto a tamaño, incluso más que las marcadas con SOM a la misma edad. Este elevado número de neuritas distróficas de gran tamaño NPY-positivas podría explicar que la expresión del ARNm de NPY no disminuyera a la edad de 6 meses en comparación a los animales controles, a pesar de la disminución de neuronas NPY-positivas. Esta disminución de somas también se apreció a los 12 meses (Fig. 3.11 D-F), edad a la que las neuritas distróficas eran muy aparentes y aparecían asociadas a las placas extracelulares (ver inserto en F). A los 18 meses de edad (Fig. 3.12), apenas podían visualizarse neuronas NPY-positivas de aspecto saludable en los animales PS1xAPP, mientras que en los animales control la apariencia del inmunomarcaje parecía prácticamente inalterable con la edad.

El estudio estereológico por edades realizado para NPY (Fig. 3.13), mostró una disminución significativa del $46,36 \pm 14,17\%$ (Tukey, $p < 0,01$) en la densidad numérica (células/mm³) de las interneuronas que expresaban NPY en la corteza entorrinal a 6 meses de edad en los animales PS1xAPP en comparación con los WT y PS1. Esta disminución se mantuvo a edades más avanzadas, de tal forma que a los 12 meses, los animales doble transgénicos mostraban una disminución del $39,77 \pm 21,52\%$ (Tukey, $p < 0,05$) en comparación con los controles y a los 18 meses, el porcentaje de disminución fue del $50,41 \pm 22,46\%$ (Tukey, $p < 0,01$). Estos resultados indican que, al igual que la población de interneuronas SOM-positivas, la población NPY-positiva es altamente vulnerable a edades tempranas (6 meses) degenerando, aproximadamente, la mitad de la población, mientras que la otra mitad es resistente y sobrevive con el paso de la edad. En los animales control también se apreció una disminución significativa en relación con el proceso normal de envejecimiento, observándose una bajada del 22% entre los animales WT de 2 y 18 meses de edad (Tukey, $p < 0,05$).

Tras observar que tanto la población que expresaba SOM como la que expresaba NPY sufrían una disminución significativa en su densidad numérica desde los 6 meses, se pasó a realizar un doble inmunomarcaje fluorescente SOM/NPY para microscopía confocal para conocer si la población que co-expresaba ambos marcadores era la más afectada en este modelo animal. El análisis se realizó en animales WT y PS1xAPP, observando principalmente las capas profundas de la corteza entorrinal donde abundan ambas poblaciones de interneuronas. Como puede observarse en la serie de microfotografías de la Fig. 3.14, los animales WT (serie A) presentaban numerosas interneuronas que co-expresaban SOM y NPY. Sin embargo, en los individuos PS1xAPP de la misma edad (serie B), el número de interneuronas doblemente marcadas descendía en general y existían numerosas neuritas distróficas positivas para ambos marcadores. Aunque no hemos realizado un estudio estereológico de las células que co-expresan SOM/NPY, el estudio cualitativo parece indicar que esta subpoblación de la corteza entorrinal se ve preferentemente afectada en los doble transgénicos, al igual que ya se ha descrito en el hipocampo de este animal (Ramos y col., 2006).

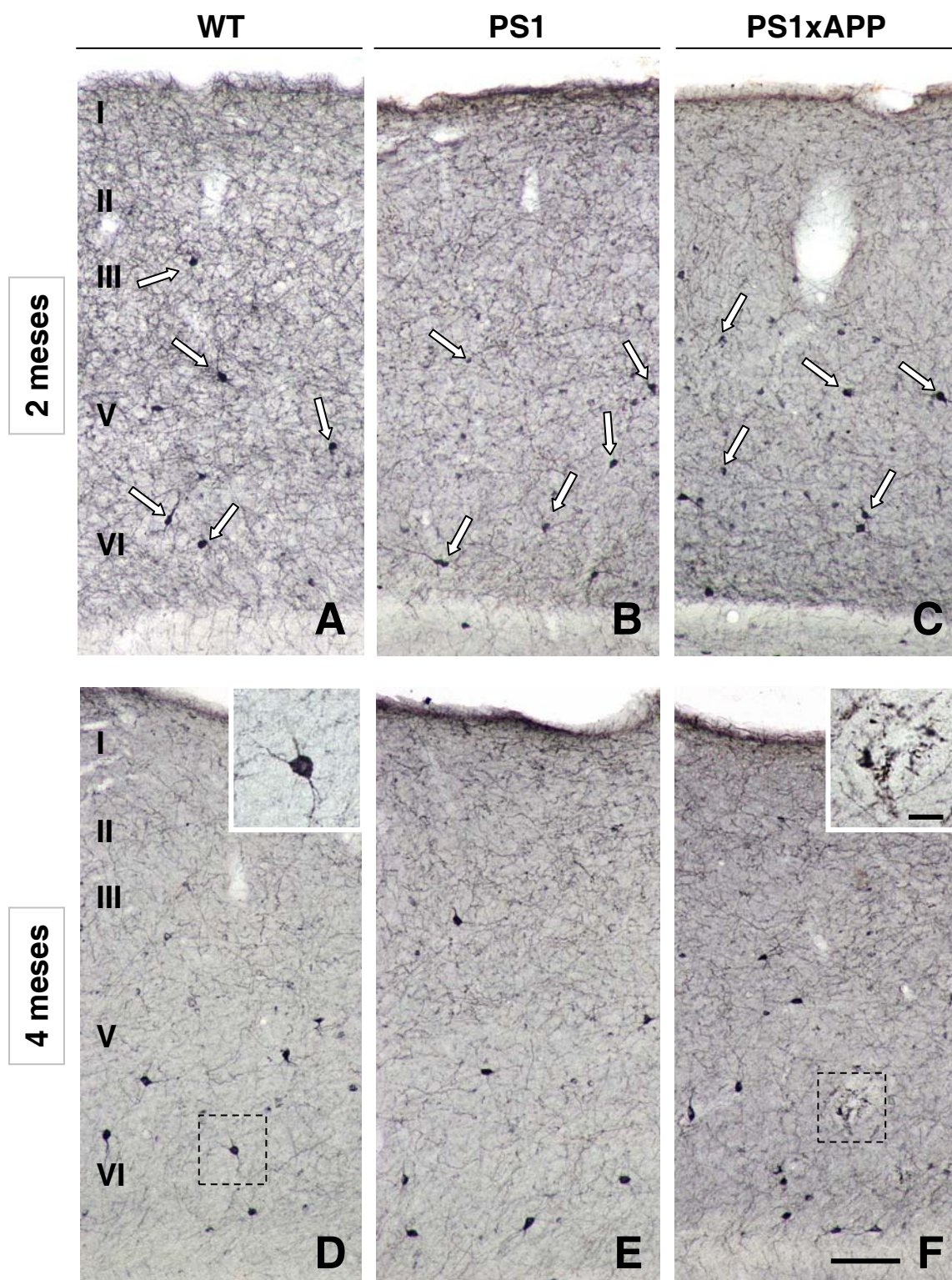


Figura 3.10. Inmunohistoquímica para NPY en la corteza entorrinal de animales WT (A y D), PS1 (B y E) y PS1xAPP (C y F) de 2 (A-C) y 4 (D-F) meses de edad. La distribución en la columna cortical, morfología celular (ver inserto en D) y número de células NPY-positivas (flechas) es similar en los tres genotipos a estas edades tempranas. En los animales PS1xAPP de 4 meses comienzan a aparecer neuritas distróficas inmunomarcadas (ver inserto en F). Barras de escala: 100 μ m (A-F); insertos: 20 μ m.

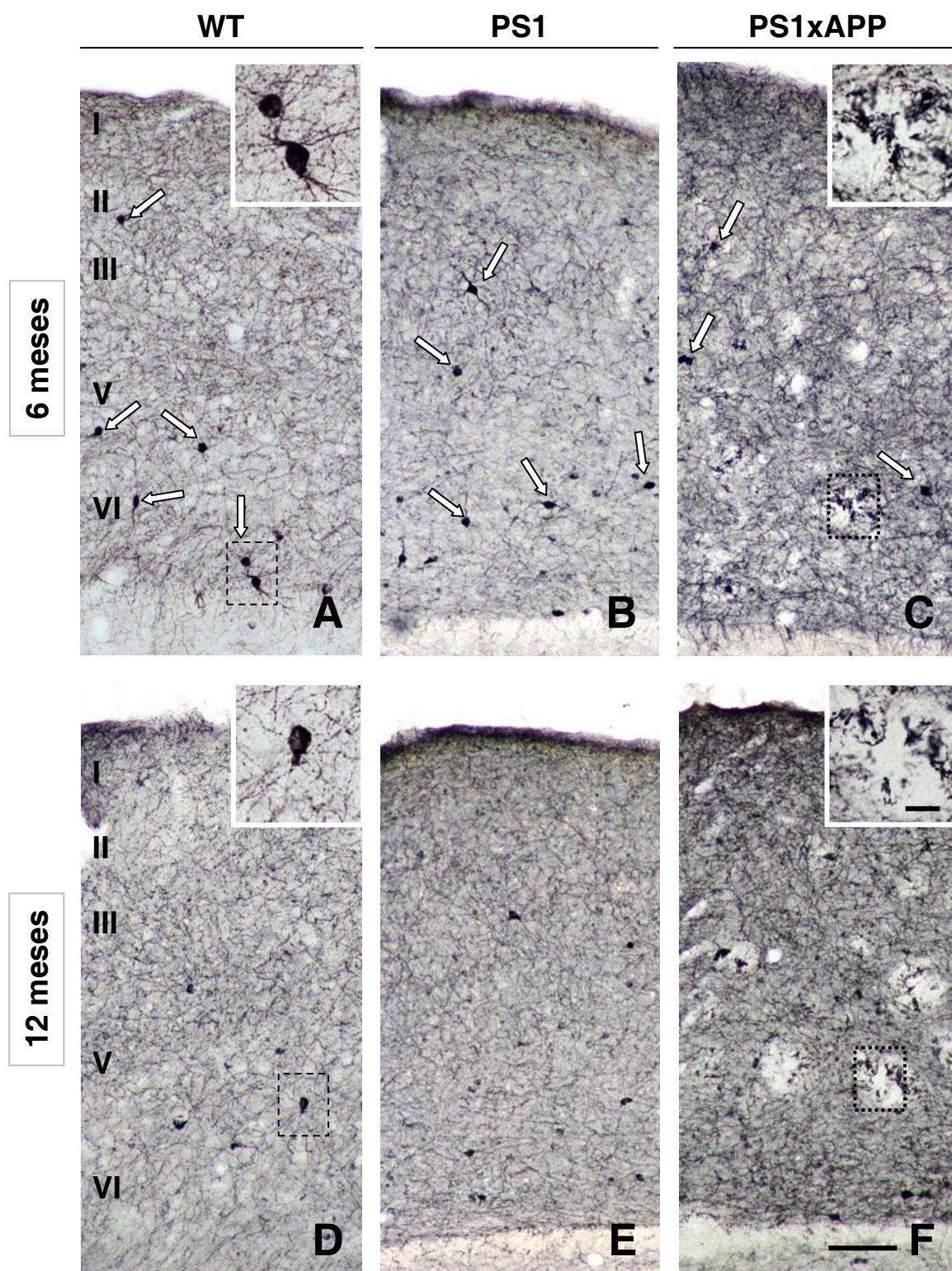


Figura 3.11. Inmunohistoquímica para NPY en la corteza entorrinal de animales WT (A y D), PS1 (B y E) y PS1xAPP (C y F) de 6 (A-C) y 12 (D-F) meses de edad. A los 6 meses de edad, la densidad de perfiles somáticos inmunomarcados (flechas) es menor en los animales PS1xAPP en comparación con los WT y PS1. Además, el número de neuritas distróficas (inserto en C) en los animales PS1xAPP es bastante prominente, así como un aumento en la intensidad de marcaje en las fibras del neuropilo. A los 12 meses de edad, estas diferencias son aún más notables. Los insertos en A y D muestran la morfología normal de las células NPY-positivas. Barras de escala: 100 μm (A-F); insertos: 20 μm .

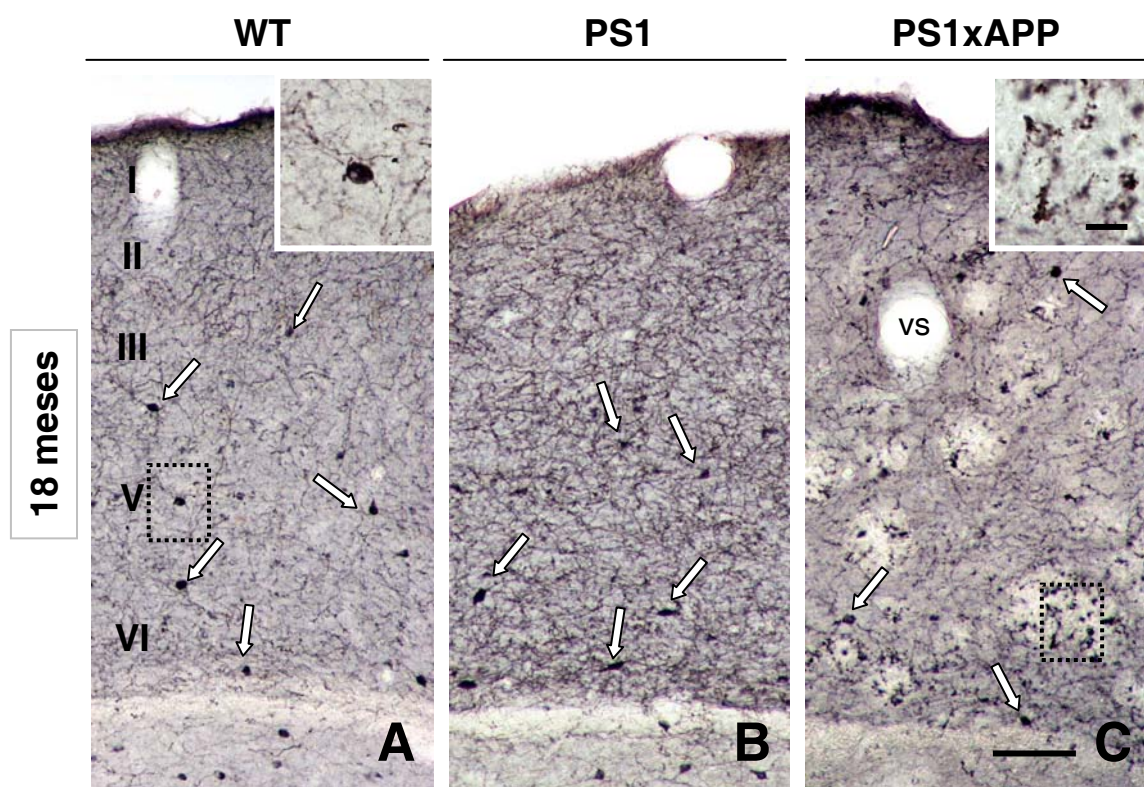


Figura 3.12. Inmunohistoquímica para NPY en la corteza entorrinal de animales WT (A), PS1 (B) y PS1xAPP (C) de 18 meses de edad. A esta avanzada edad, el menor número de interneuronas NPY-positivas (flechas) en los animales PS1xAPP es evidente respecto a los WT y PS1. Además, en los doble transgénicos existe una gran cantidad de neuritas distróficas (ver inserto en C) a lo largo de toda la columna cortical, fundamentalmente asociadas a las placas amiloides que aparecen aquí como estructuras redondeadas inmunonegativas. vs: vaso sanguíneo. Barras de escala: 100 μ m (A-C); insertos: 20 μ m.

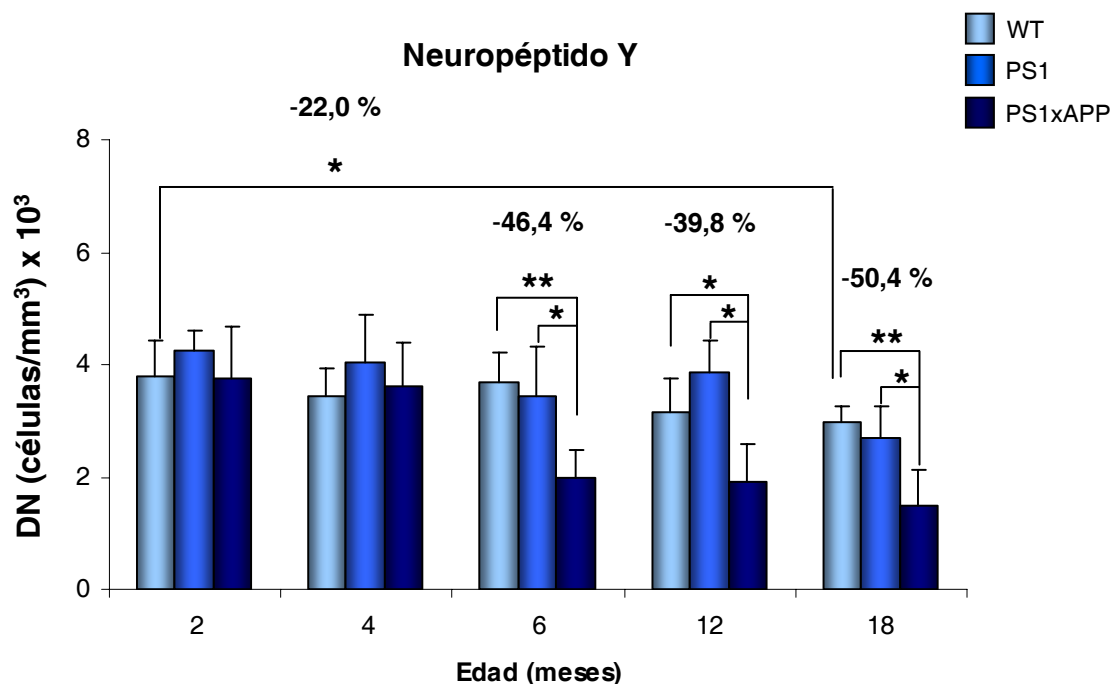


Figura 3.13. Recuento estereológico de la población de interneuronas NPY-positivas en la corteza entorrinal en los animales WT, PS1 y PS1xAPP desde los 2 a los 18 meses de edad. La densidad numérica (DN) de interneuronas que contienen NPY desciende de forma notable en los animales PS1xAPP a los 6 meses respecto a los WT y PS1 de la misma edad. Esta disminución se mantiene aproximadamente en la misma proporción a los 12 y 18 meses de edad. También se observa un ligero descenso de esta población en los animales WT y PS1 con el envejecimiento normal. n=4; ADEVA de una vía $F(14, 41)=6,00$ $p<0,001$; Tukey. * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

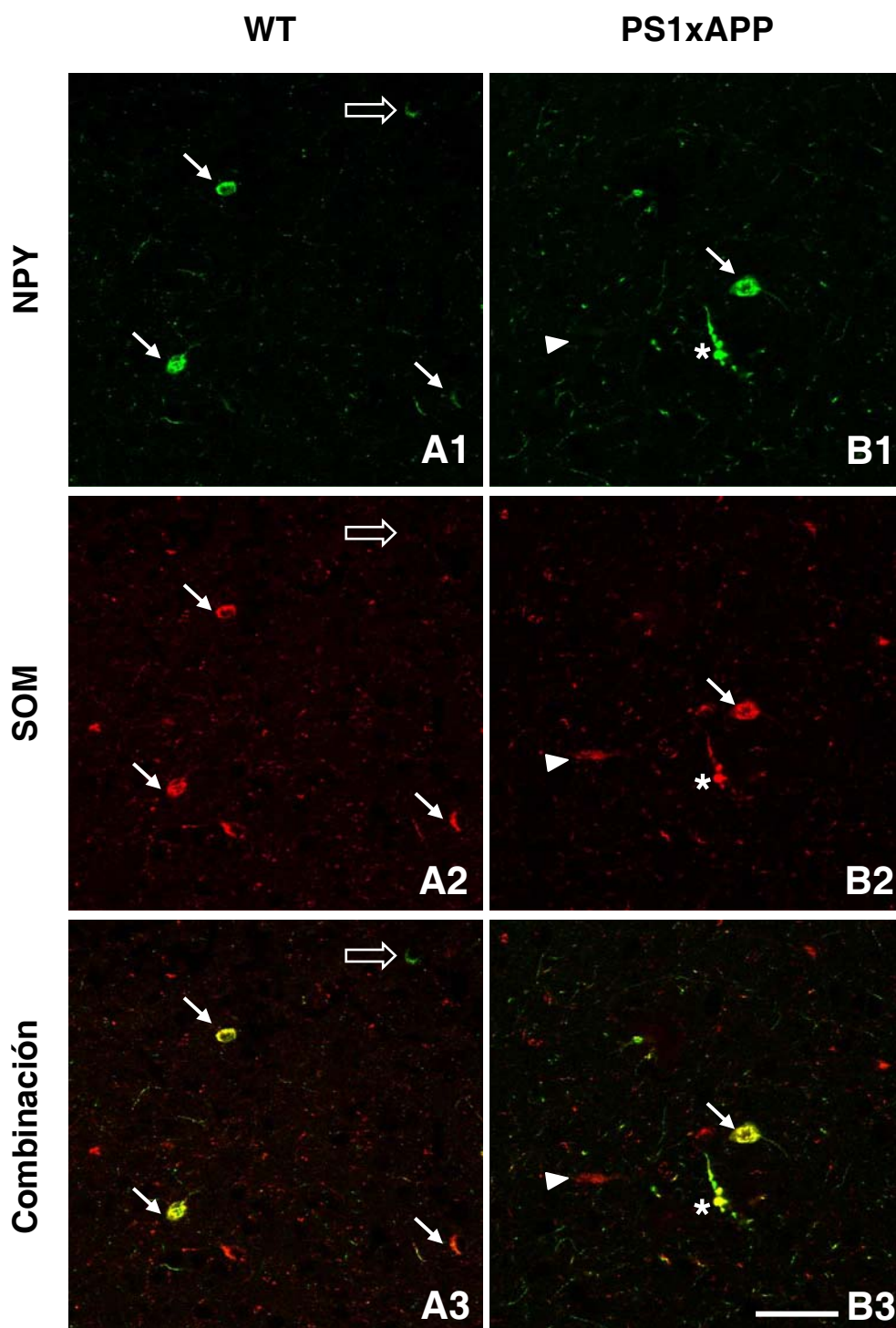


Figura 3.14. Inmunofluorescencia doble para SOM (rojo) /NPY (verde) a microscopía confocal en secciones de corteza entorrinal de animales WT y PS1xAPP a 6 meses de edad. En estas imágenes se observa el marcaje de interneuronas que contienen NPY (en verde, A1 y B1) y SOM (en rojo, A2 y B2), así como su colocación (en amarillo, A3 y B3). Los animales PS1xAPP (B1-B3) a los 6 meses, poseen un menor número de interneuronas SOM-positivas (cabezas de flecha) y de interneuronas que contienen NPY (flechas abiertas), en comparación con los animales WT (A1-A3). De igual forma, existe un menor número de interneuronas que co-expresan ambos neuropéptidos (flechas) en los animales PS1xAPP. Además, los doble transgénicos presentan neuritas distróficas inmunomarcadas para SOM y NPY (asteriscos). Barra de escala: 50 μ m.

3.1.1.5. Las interneuronas que expresan PV son resistentes al proceso de neurodegeneración en el modelo PS1xAPP

A continuación, se procedió al estudio de otra subpoblación mayoritaria de interneuronas GABAérgicas, aquellas que expresan la proteína ligadora de calcio parvalbúmina. Esta subpoblación constituye, aproximadamente, el 40% de las interneuronas de la corteza (Gonchar y col., 2008). Son interneuronas GABAérgicas de tipo en candelabro y células en cesto (aunque no todas las células en cesto son PV-positivas), que se ubican desde la capa II a la V, rara vez en la capa VI, siendo más abundantes en las capas II y III, e innervando a las neuronas piramidales de forma perisomática, en el soma, cono axónico y las dendritas proximales (Markram y col., 2004; Canto y col., 2008). En general, las neuronas que expresan PV no suelen co-expresar otras proteínas ligadoras de calcio o neuropéptidos, a excepción de calbindina en determinadas ocasiones (Kubota y col., 1994; Gonchar y col., 2008). La morfología de las neuronas PV-positivas era multipolar, bipolar o bipenacheada. Los plexos inmunopositivos para PV se localizaban con una mayor densidad en las capas II/III y V, donde se encuentran los somas de neuronas piramidales a las que innervan.

El estudio de expresión temporal de PV mediante inmunohistoquímica mostró que a edades tempranas (2, 4 y 6 meses) no existían diferencias aparentes en cuanto al patrón de marcaje (distribución, morfología y densidad de somas) en los doble transgénicos respecto a los controles (Fig. 3.15 y Fig. 3.16 A-C). Tampoco se apreció ninguna neurita distrófica PV-positiva en estos animales. Es más, a edades ya avanzadas, como son los 12 y 18 meses de edad (Fig. 3.16 D-F y Fig. 3.17, respectivamente), los animales doble transgénicos seguían mostrando un patrón de inmunorreactividad para PV similar a los animales control de la misma edad y, en ningún caso, se observaron neuritas distróficas. La cuantificación estereológica de las interneuronas PV-positivas en la corteza entorrinal realizada en los animales WT, PS1 y PS1xAPP a las edades de 2, 4, 6, 12 y 18 meses (n=4-7) (Fig. 3.18), mostró que no existían diferencias significativas (ADEVA $p>0,05$) en la densidad numérica (células/mm³) entre los genotipos control (WT y PS1) y los animales doble transgénicos PS1xAPP a las edades estudiadas. Teniendo en cuenta la ausencia de neuritas distróficas y de cambios en la densidad neuronal, esta subpoblación de neuronas PV-positiva parecía ser más resistente o menos vulnerable a los procesos neurodegenerativos que se producían en su entorno.

3.1.1.6. Las interneuronas que expresan CR se ven afectadas de forma diferencial en el modelo PS1xAPP a edades tempranas

La calretinina es una proteína ligadora de calcio expresada por subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas de circuito local, tales como células bipenacheadas, células bipolares y células doble bouquet, con morfología bipolar o multipolar (DeFelipe y col., 1990; Miettinen y col., 1997; Markram y col., 2004). La CR es expresada en capa I por interneuronas y células Cajal-Retzius (Mikkonen y col., 1997). Las células CR-positivas son más abundantes en la corteza entorrinal lateral que en la medial, sobre todo en capa III

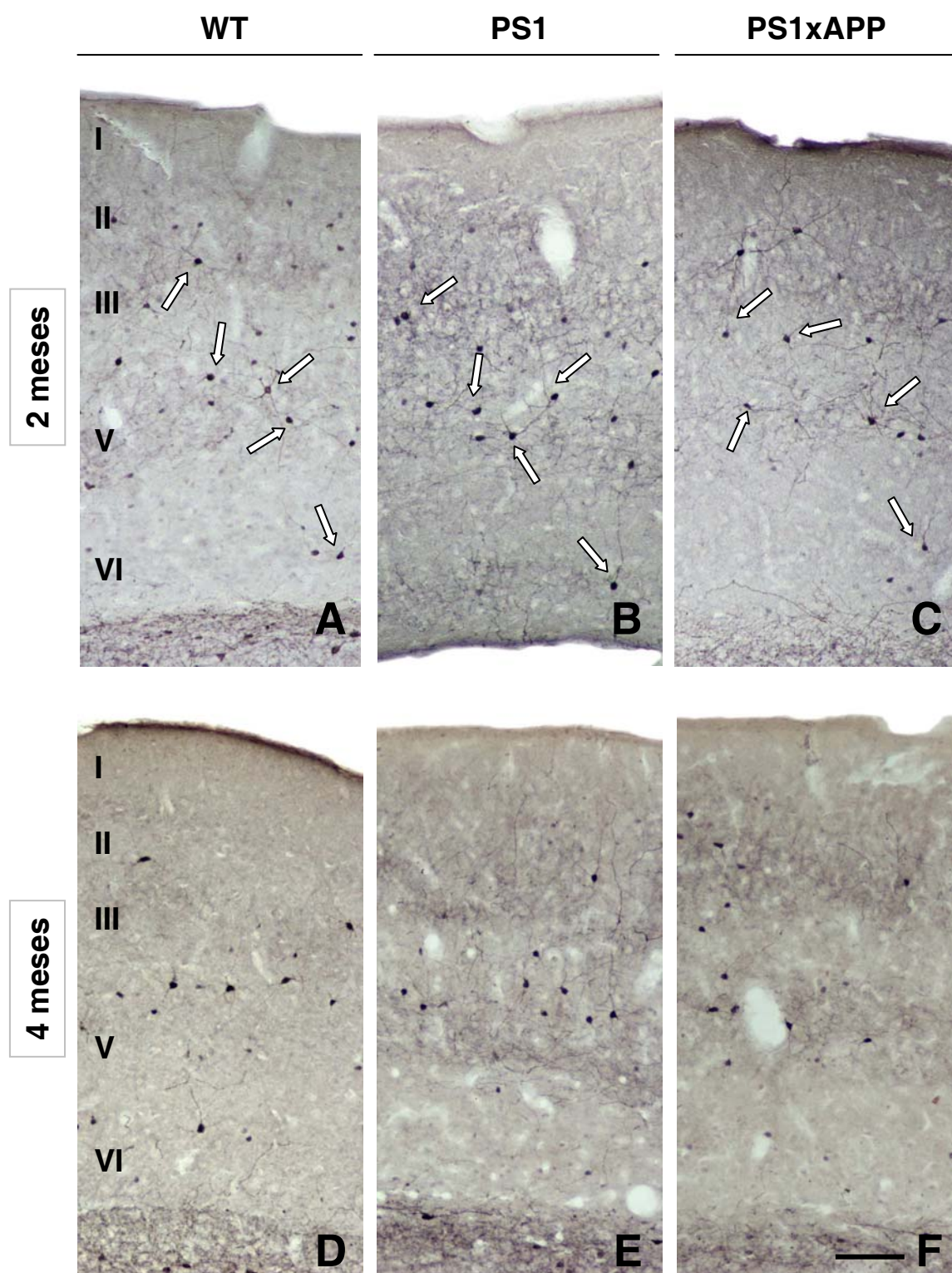


Figura 3.15. Inmunohistoquímica para parvalbúmina en la corteza entorrinal de animales WT (A y D), PS1 (B y E) y PS1xAPP (C y F) de 2 (A-C) y 4 (D-F) meses de edad. En el caso de las interneuronas que presentan la proteína ligadora de calcio parvalbúmina (flechas), no existen diferencias aparentes en la distribución, morfología o densidad neuronal entre los animales PS1xAPP y los controles WT o transgénicos PS1 de la misma edad. Es de destacar, además, que no se observan neuritas distróficas PV-positivas en los PS1xAPP. Barra de escala: 100 μ m.

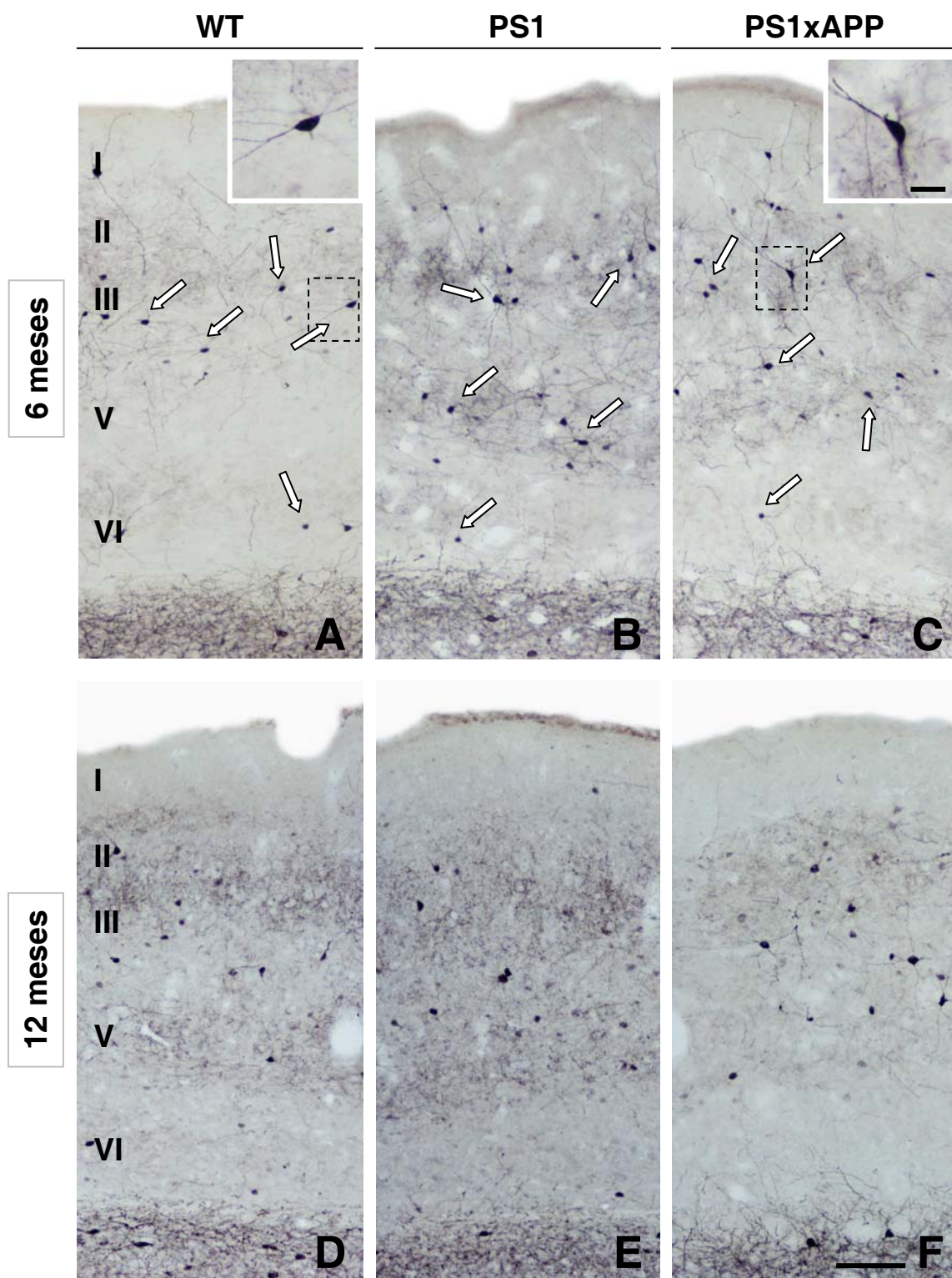


Figura 3.16. Inmunohistoquímica para PV en la corteza entorrinal de animales WT (A y D), PS1 (B y E) y PS1xAPP (C y F) de 6 (A-C) y 12 (D-F) meses de edad. Como puede apreciarse en las imágenes microscópicas, no existen diferencias evidentes ni en la distribución, morfología o densidad de estas interneuronas entre los doble transgénicos PS1xAPP (C y F) y los individuos WT (A y D) ó PS1 (B y E) a 6 y 12 meses de edad. La morfología de las células PV-positivas es similar entre los transgénicos y los WT (comparar insertos en A y C) y, además, no se observan neuritas distróficas inmunomarcadas. Barras de escala: 100 μ m (A-F); insertos: 20 μ m.

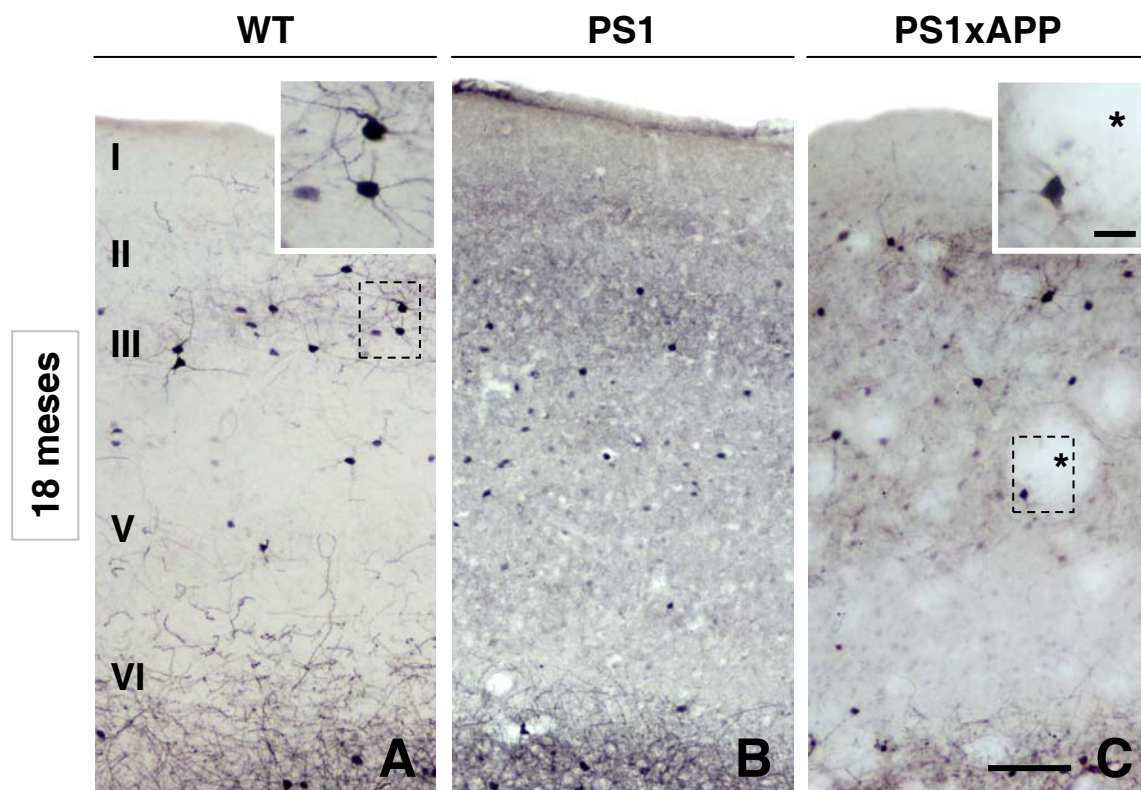


Figura 3.17. Inmunohistoquímica para PV en la corteza entorrinal de animales WT (A), PS1 (B) y PS1xAPP (C) de 18 meses de edad. A esta avanzada edad, es notable la buena preservación de la inmunorreactividad para PV en los animales PS1xAPP, no apreciándose diferencias significativas en cuanto distribución, morfología o densidad celular con los animales WT o PS1. El inserto en A muestra un detalle de neuronas PV-positiva en los WT, mientras que el inserto en C muestra una neurona inmunorreactiva para PV en un animal PS1xAPP localizada en la periferia de una placa amiloide (inmunonegativa) y que presenta un aspecto normal. No se observan neuritis distróficas PV-positivas. Barras de escala: 100 μ m (A-C); insertos: 20 μ m.

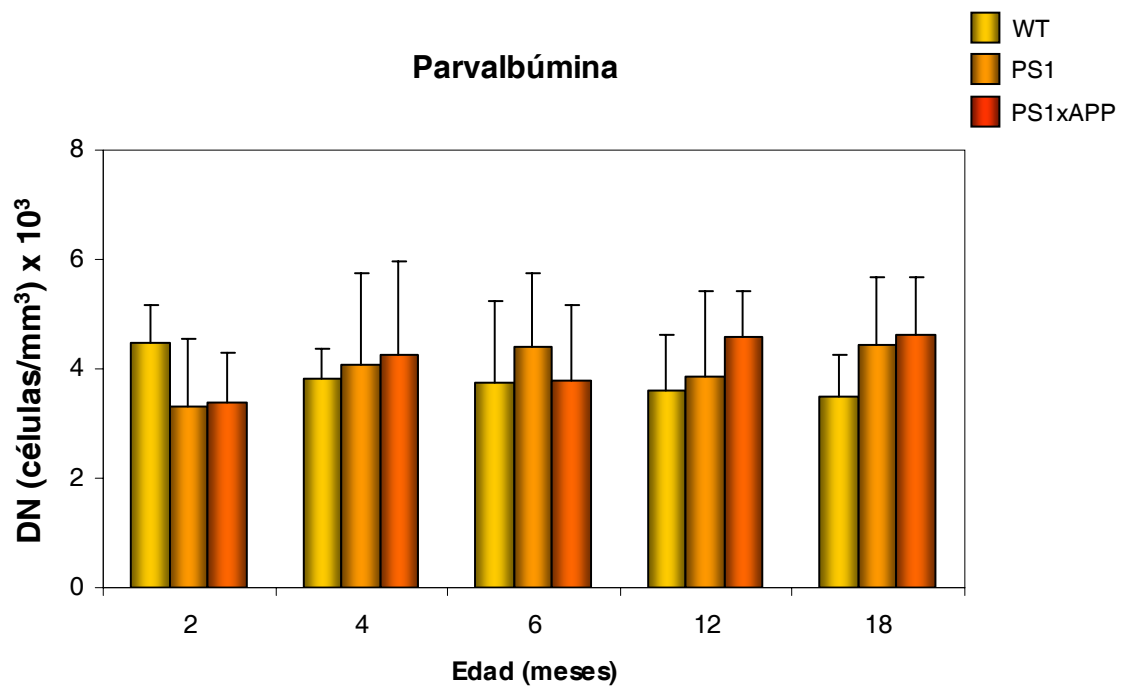


Figura 3.18. Recuento estereológico de la población de interneuronas PV-positivas en la corteza entorrinal de los animales WT, PS1 y PS1xAPP desde los 2 a los 18 meses de edad. La densidad numérica (DN) para esta población de interneuronas es prácticamente constante entre los tres genotipos a todas la edades analizadas. Además, no existen diferencias significativas a lo largo del proceso de envejecimiento, por lo que esta población de interneuronas se encuentra preservada tanto con la edad como con el genotipo. $n=4-7$; ADEVA de una vía $F(14, 54)=0,55$; $p>0,05$.

(Miettinen y col., 1997; Wouterlood y col., 2000). Algunas neuronas CR-positivas de capa V de la corteza entorrinal son interneuronas excitadoras de naturaleza glutamatérgica (Wouterlood y col., 2000).

De acuerdo a lo descrito por otros autores, en nuestro modelo transgénico las células CR-positivas se encontraron a lo largo de toda la columna cortical, siendo muy abundantes en capas II, III y V. Estas células, en general, poseían un soma con una morfología fusiforme y eran bipolares o multipolares. La intensa inmunorreactividad del plexo CR-positivo en la corteza entorrinal lateral, sobre todo en las capas I y V, permitió diferenciar perfectamente los límites de esta área cortical, tal y como se describe en la bibliografía (Van Groen, 2001; Canto y col., 2008). La superficie pial también se marcaba intensamente con la inmunotinción para CR.

A la edad temprana de 2 meses (Fig. 3.19 A-C), se observó una gran cantidad de células CR-positivas a lo largo de toda la columna cortical. En las capas superficiales II y III, las células marcadas mostraban ramificaciones perpendiculares a las láminas de la corteza mientras que, en las capas profundas, la arborización fue más aleatoria. A esta edad no se aprecian diferencias en la densidad, morfología o distribución de las células CR-positivas entre los 3 genotipos estudiados. A los 6 meses (Fig. 3.19 D-F), el patrón de inmunorreactividad para CR fue muy similar a edades anteriores, aunque con una densidad neuronal visiblemente menor que a los 2 meses en los tres genotipo analizados. En los animales PS1xAPP fue a esta edad cuando empezaron a aparecer las primeras neuritas distróficas inmunopositivas para este marcador, como puede apreciarse en la imagen del inserto de la Fig. 3.19 F, localizadas alrededor de los depósitos extracelulares de las capas profundas. A los 18 meses de edad (Fig. 3.20), la distribución y el marcaje de las neuronas CR-positivas mantuvo el mismo patrón que a edades tempranas, aunque la densidad de las neuronas CR-positivas parecía disminuir con la edad del animal, de forma similar en los tres genotipos estudiados. Además, en los animales PS1xAPP, el número de neuritas distróficas aumentó en las mediaciones de las placas amiloides (ver inserto en C).

La cuantificación estereológica de las neuronas que expresan CR a las edades de 2, 4, 6, 12 y 18 meses (Fig. 3.21 A) mostró que no existían diferencias significativas entre los distintos genotipos estudiados con el transcurso de la edad (ADEVA $p > 0,05$; $n = 4-7$). Sin embargo, aunque no era estadísticamente significativo, en los animales WT se apreció una disminución de la densidad de las neuronas CR-positivas con la edad. Así mismo, en los animales PS1xAPP se detectó una bajada en la densidad neuronal a edades tardías, como son los 18 meses de edad.

Teniendo en cuenta que las neuronas que expresan CR son bastante heterogéneas, realizamos una segunda aproximación, cuantificando en este caso las poblaciones de las capas superficiales y las profundas de la corteza entorrinal en los animales WT y PS1xAPP a 2 y 6 meses de edad (Fig. 3.21 B), ya que, como se ha comentado antes, gran parte de las neuronas CR-positivas de las capas superficiales son interneuronas GABAérgicas de circuito local, mientras que, una parte de las neuronas CR-positivas de las capas profundas son interneuronas excitadoras de naturaleza glutamatérgica (Wouterlood, 2000). Este estudio mostró que, a 6 meses de edad, existía una disminución significativa ($17,27 \pm 7,07\%$;

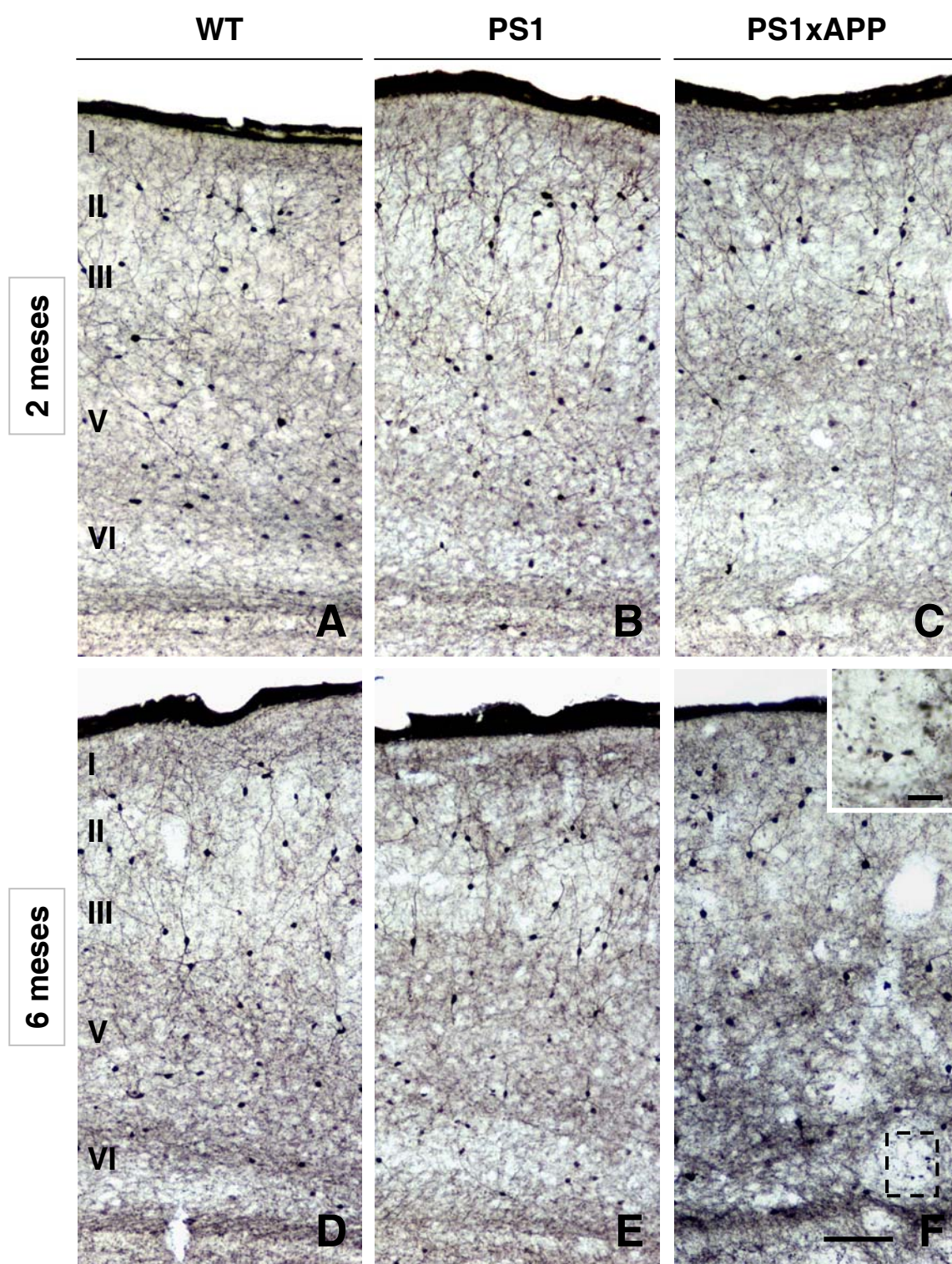


Figura 3.19. Inmunohistoquímica para calretinina en la corteza entorrinal de animales WT (A y D), PS1 (B y E) y PS1xAPP (C y F) de 2 (A-C) y 6 (D-F) meses de edad. En el caso de las interneuronas que expresan calretinina, a los 2 meses de edad, los animales PS1xAPP (C) no muestran cambios en la distribución, morfología o densidad celular en comparación con los animales WT (A) y PS1 (B). Sin embargo, a los 6 meses comienzan a aparecer neuritas distróficas (inserto en F) en los animales PS1xAPP, aunque la densidad de neuronas CR-positivas permanece prácticamente constante en comparación con los controles (D y E). Barras de escala: 100 μ m (A-F); inserto: 20 μ m.

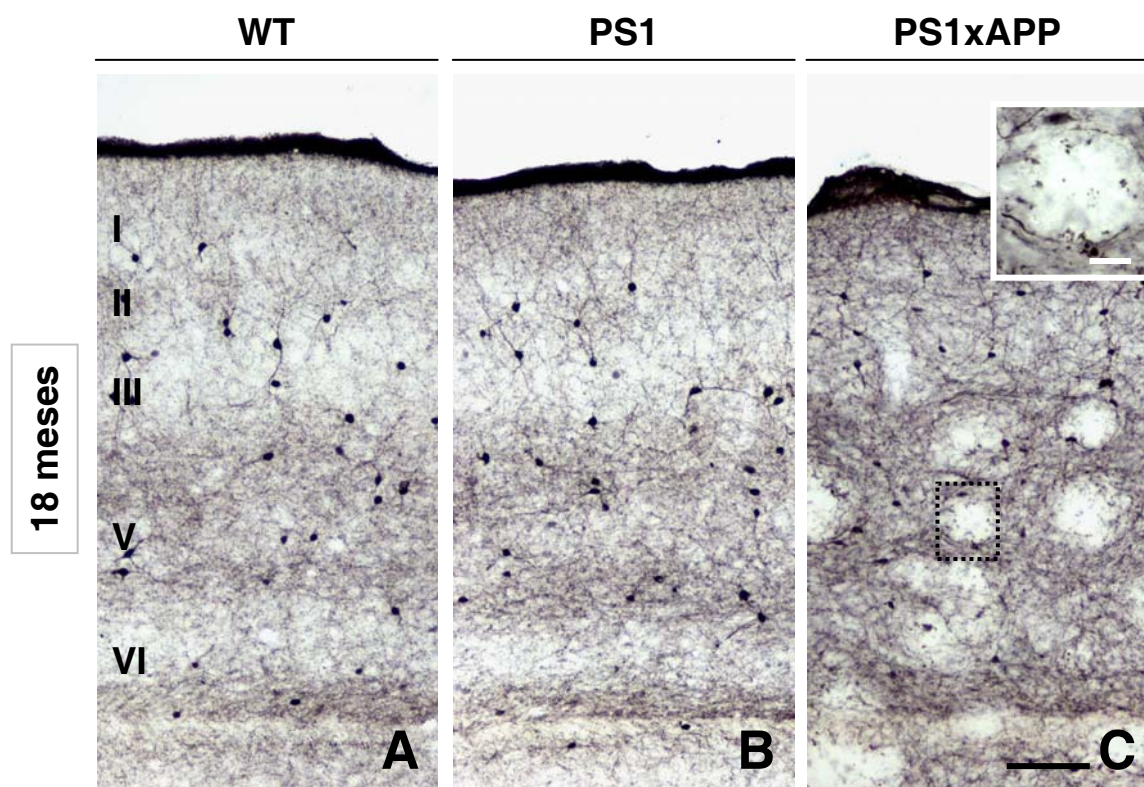


Figura 3.20. Inmunohistoquímica para calretinina en la corteza entorrinal de animales WT (A), PS1 (B) y PS1xAPP (C) de 18 meses de edad. A esta edad, la densidad de neuronas CR-positivas es bastante similar en los animales doble transgénicos (C) en comparación con los animales controles (A) y PS1 (B) de la misma edad a lo largo de toda la columna cortical. La principal diferencia cualitativa es la aparición de neuritas distróficas inmunomarcadas en los alrededores de los depósitos extracelulares amiloides, que aparecen aquí como estructuras redondeadas inmunonegativas (ver inserto en C). Barras de escala: 100 μm (A-C); inserto: 20 μm .

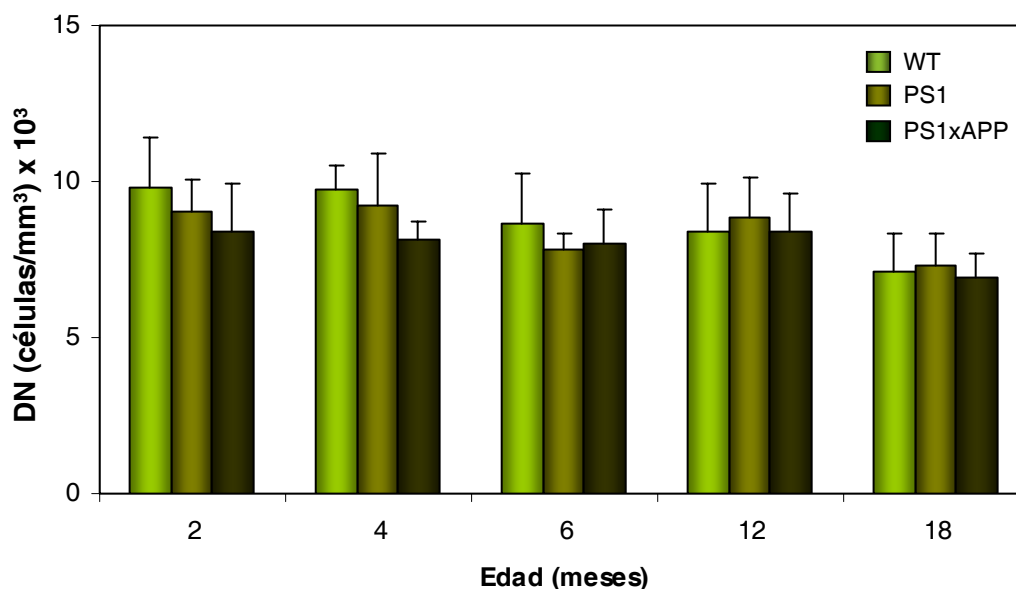
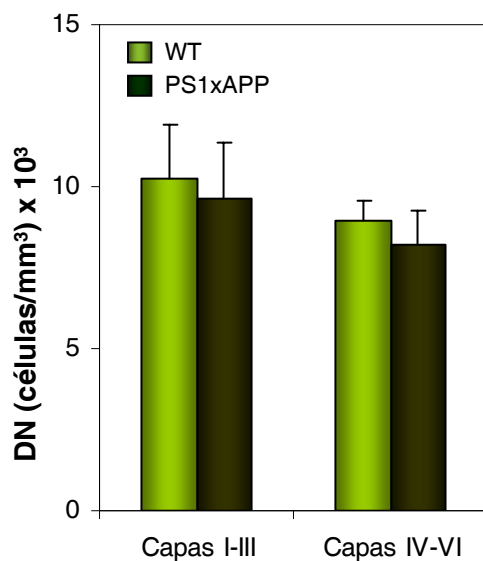
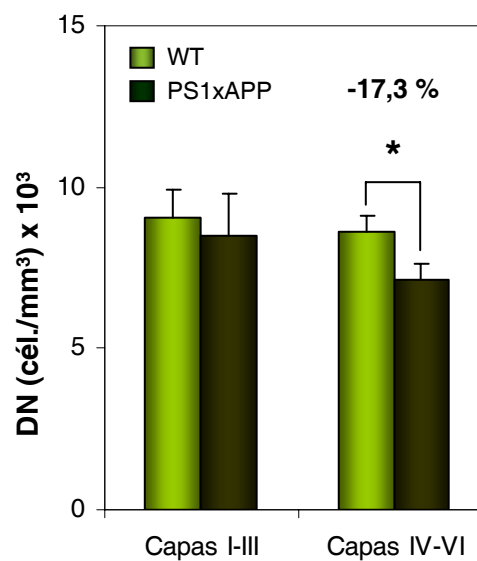
A**Calretinina****B****CR 2 meses****CR 6 meses**

Figura 3.21. Recuento estereológico de la población de neuronas CR-positivas en la corteza entorrinal. A) Estudio en animales WT, PS1 y PS1xAPP a lo largo del envejecimiento. B) Estudio en animales WT y PS1xAPP a 2 y 6 meses, diferenciando las poblaciones de capas superficiales (I-III) y capas profundas (IV-VI). La densidad numérica (DN) de la población CR-positiva en los tres genotipos disminuye ligeramente con la edad, aunque se mantiene sin cambios entre los genotipos. El estudio por separado en capas superficiales (interneuronas inhibitoras) y profundas (interneuronas excitadoras) revela la existencia de una disminución significativa de estas últimas a la edad de 6 meses en los animales PS1xAPP en comparación con los WT (B). n=4-6; ADEVA de una vía, $F(14, 44)=1,97$; $p>0,05$ (A); T de Student, $*p=0,01$ (B).

T de Student, $p=0,01$, $n=4$) de la densidad de células CR-positivas en las capas profundas de los animales PS1xAPP respecto a los controles de la misma edad. A los 2 meses de edad, no se encontraron diferencias significativas. Por lo tanto, podemos decir que existe un proceso neurodegenerativo temprano de las células CR-positivas sólo en las capas profundas de la corteza entorrinal, aunque el grado de afectación de esta población neuronal es mucho menor que el de población SOM/NPY.

3.1.2. Neuronas principales

3.1.2.1. Existe pérdida significativa de neuronas principales en las capas profundas de la corteza entorrinal del modelo PS1xAPP a los 6 meses de edad

El siguiente paso fue analizar qué ocurría con la población de neuronas principales (neuronas de proyección glutamatérgicas) de la corteza entorrinal en los animales PS1xAPP, ya que habíamos observado con anterioridad que existía una marcada disminución del número de núcleos NeuN-positivos en las capas profundas de la corteza entorrinal a edades tempranas, que no parece justificarse sólo con la pérdida de interneuronas SOM, NPY y CR

Para esto existía una problemática metodológica, ya que no existen actualmente buenos marcadores específicos de neuronas principales. En regiones como el hipocampo es más fácil estudiarlas, ya que se encuentran agrupadas específicamente en la capa piramidal del hipocampo propio y en la capa granular del giro dentado. Sin embargo, en la neocorteza se encuentran repartidas a lo largo de la columna cortical, entremezcladas con las interneuronas y, a pesar de que las neuronas principales son más numerosas y en algunos casos diferenciables morfológicamente, es bastante difícil hacer una discriminación visual de ambas poblaciones por su localización o su forma exclusivamente. Por lo tanto, la mejor aproximación para identificar a las células principales corticales era diferenciarlas de las interneuronas por su contenido neuroquímico. La forma más obvia es mediante dobles marcajes GABA o GAD67 con NeuN, de tal forma que las células marcadas sólo con NeuN serían las principales o glutamatérgicas. Sin embargo, experimentos previos del grupo y de otros grupos (Wouterlood y Pothuizen, 2000) habían constatado que con los anticuerpos anti-GABA o anti-GAD67 no se conseguía un marcaje de la población GABAérgica al completo. Esto podría deberse a problemas de penetración del anticuerpo en el tejido, difusión de las moléculas del soma a otros compartimentos celulares, bajo nivel de expresión para la detección inmunohistoquímica, etc. Por lo tanto, decidimos buscar otra aproximación experimental que nos permitiera marcar todas las poblaciones de interneuronas. Para ello, en este trabajo hemos puesto a punto una inmunohistoquímica múltiple (5x) para microscopía óptica convencional, empleando cinco anticuerpos distintos y revelando con dos cromógenos de diferente color. Como se explica en el apartado 2.2.2.5 de materiales y métodos, se emplearon los anticuerpos contra SOM, PV, CR y VIP que marcan prácticamente todas las subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas (un 95% aproximadamente) (Miyoshi y col., 2007; Gonchar y col., 2008). La incubación con los

diferentes anticuerpos específicos para las interneuronas fue secuencial y se revelaron todos de forma conjunta con solución de DAB-Niquel. De esta forma se marcaron todos los tipos de interneuronas a nivel citoplasmático de color azul-grisáceo. Posteriormente, las secciones se incubaron con el anticuerpo contra núcleos de neuronas maduras NeuN, que se reveló en marrón-anaranjado con DAB. Por lo tanto, las interneuronas poseían un doble marcaje nuclear y citoplasmático, mientras que el resto, las neuronas principales, poseían sólo color marrón en el núcleo. El marcaje de ambos tipos de neuronas en compartimentos distintos (interneuronas con citoplasma azul) y principales (núcleos marrones) garantizaba el no solapamiento de ambas reacciones de inmunoperoxidasa. Además, se realizaron los controles apropiados para asegurar la ausencia de falsos positivos.

La inmunohistoquímica 5x a los 2 meses de edad (Fig. 3.22 A-C), mostró resultados similares en los tres genotipos estudiados en cuanto a distribución laminar y densidad neuronal de las neuronas principales. Las neuronas principales (sólo marcadas con NeuN) se localizaban en capas II, III, V y VI en color marrón anaranjado. La cuantificación estereológica (Fig. 3.22 D), realizada en las capas superficiales y profundas por separado, mostró que no existían diferencias significativas a los 2 meses en la densidad numérica de las neuronas piramidales analizadas entre los animales control WT y PS1 y los doble transgénicos PS1xAPP. A los 6 meses de edad (Fig. 3.23 A-C), se observó, como se esperaba, que el número de neuronas principales disminuía específicamente en las capas profundas de la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP, en comparación con los animales control de la misma edad. Al realizar la cuantificación estereológica (Fig. 3.23 D), se observó una disminución significativa ($27,26 \pm 8,24\%$; T de Student, $p < 0,001$, $n=6$) de la densidad numérica (células/mm³) de neuronas piramidales en las capas profundas de la corteza entorrinal en los animales PS1xAPP en comparación con los animales WT y PS1, aunque no en las capas superficiales.

Además, se analizó el volumen de la corteza entorrinal total y de la capa molecular I (que contiene gran cantidad de fibras) mediante el principio de Cavalieri y no se encontraron diferencias significativas en el volumen total a los 6 meses de edad entre los animales WT ($1,15 \pm 0,22$ mm³), PS1 ($1,11 \pm 0,15$ mm³) y los animales PS1xAPP ($1,12 \pm 0,23$ mm³), ni tampoco en el volumen de la capa I, con valores muy similares entre los distintos genotipos: WT ($0,21 \pm 0,05$ mm³), PS1 ($0,21 \pm 0,02$ mm³) y PS1xAPP ($0,19 \pm 0,05$ mm³). Por lo tanto, al menos a esta edad, no existía atrofia de la corteza entorrinal en los animales doble transgénicos en comparación con los controles.

El empleo del marcador reelina permitió analizar mediante otro marcaje neuroquímico la población de neuronas principales de las capas superficiales. Aunque la reelina es expresada por distintos tipos neuronales, como las células Cajal-Retzius en capa I (que intervienen en el desarrollo, la laminación y el posicionamiento de las células corticales en capas durante el desarrollo cerebral) (Riedel y col., 2003), es expresada, principalmente, por las neuronas principales de capa II (Pesold y col., 1998; Chin y col., 2007) y menos abundantemente en capa III. Estas neuronas principales que expresan reelina proyectan hacia el hipocampo (Miettinen y col., 2005). Sólo un pequeño grupo de neuronas no

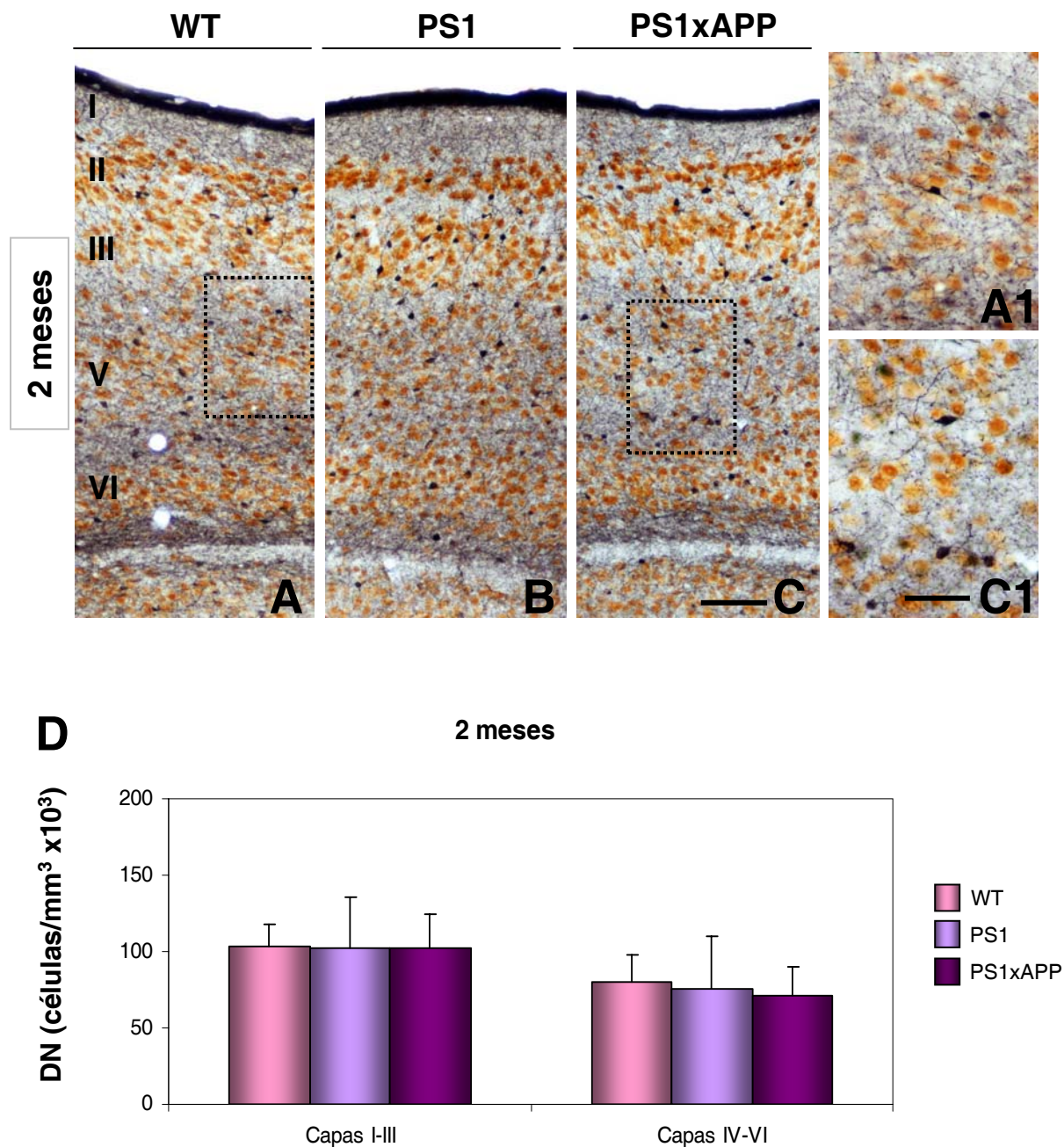


Figura 3.22. Estudio de las neuronas principales en la corteza entorrinal a los 2 meses de edad. **A-C)** Inmunohistoquímica múltiple para interneuronas (SOM, NPY, PV y CR) y neuronas en general (NeuN) en animales WT (A y A1), PS1 (B) y PS1xAPP (C y C1). La inmunotinción múltiple (5x) permite diferenciar las interneuronas corticales (de color azul oscuro) y las neuronas principales (marcadas sólo de color marrón). El estudio comparativo no revela diferencias cualitativas visibles en estas dos poblaciones celulares entre los tres genotipos a esta edad. **D)** Recuento estereológico de la densidad (neuronas/mm³) de neuronas principales en capas superficiales (I-III) y capas profundas (IV-VI). No existen diferencias significativas en la densidad numérica (DN) de las neuronas principales (células marcadas sólo con NeuN) en los animales PS1xAPP respecto a los WT y PS1 en las dos regiones analizadas. n=5; Barras de escala: 100 µm (A-C); 50 µm (A1 y C1).

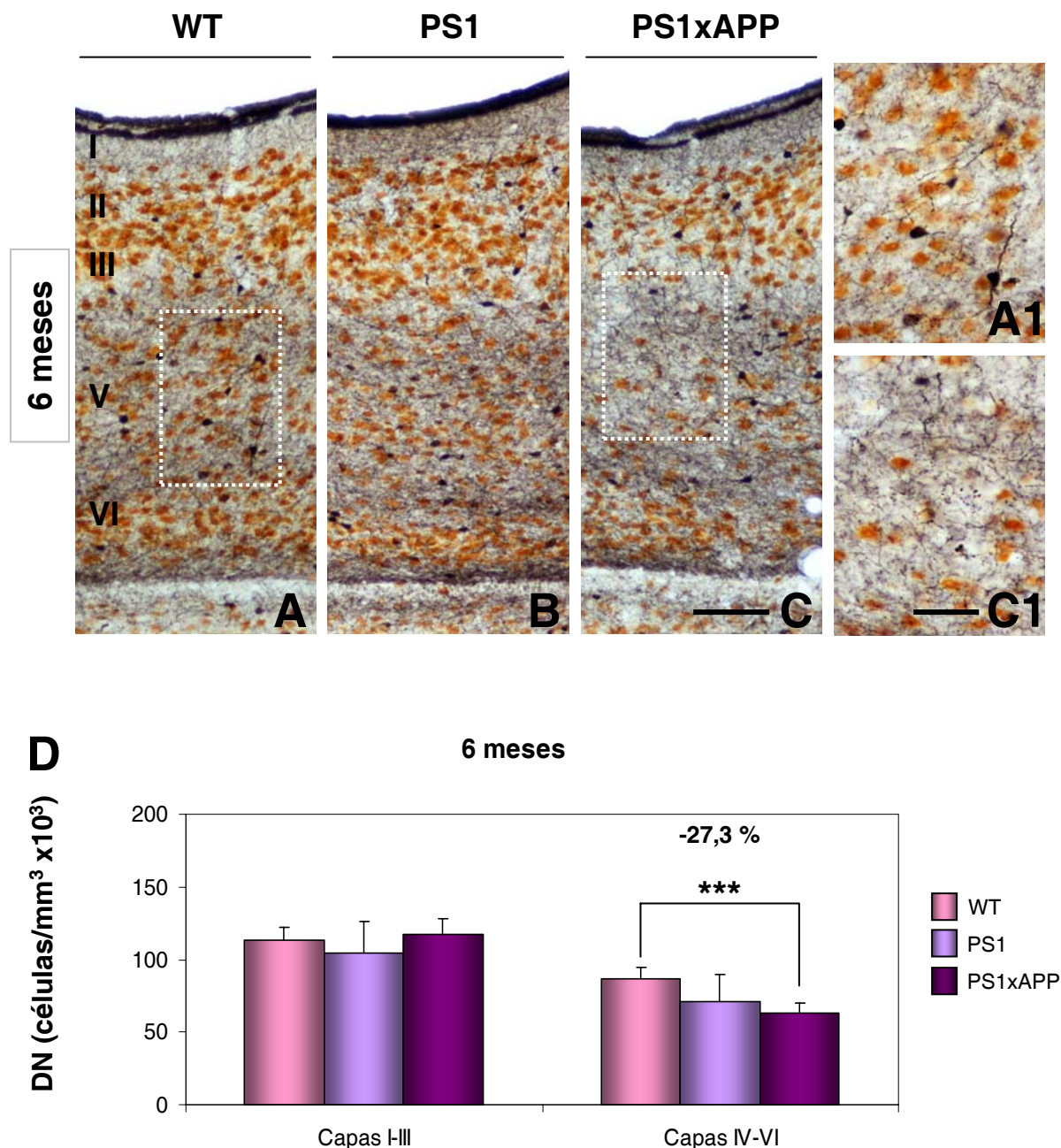


Figura 3.23. Estudio de la población de neuronas principales en la corteza entorrinal a los 6 meses de edad. **A-C)** Inmunohistoquímica múltiple para interneuronas (SOM, NPY, PV y CR) y neuronas en general (NeuN) en animales WT (A y A1), PS1 (B) y PS1xAPP (C y C1). La inmunotinción múltiple (5x) permite diferenciar las interneuronas corticales (de color azul oscuro) de las neuronas principales (marcadas sólo de color marrón). El estudio comparativo revela diferencias cualitativas visibles en estas dos poblaciones celulares en los animales PS1xAPP respecto a los WT y PS1 de la misma edad, siendo bastante patente una reducción de neuronas principales (marcadas sólo con NeuN) en capas profundas en los doble transgénicos. **D) Recuento estereológico de la densidad (neuronas/mm³) de neuronas principales en capas superficiales (I-III) y capas profundas (IV-VI).** El estudio cuantitativo revela una reducción significativa de la densidad numérica (DN) para la población de neuronas principales de los animales PS1xAPP en las capas profundas y no en las superficiales. n=5; T de Student, *** p< 0,001. Barra de escala: 100 µm (A-C); 50 µm (A1 y C1).

piramidales GABAérgicas expresan esta proteína (Pesold y col., 1998; Chin y col., 2007) y se encuentran en las capas profundas de la corteza entorrinal.

Se ha realizado un estudio inmunohistoquímico de las neuronas reelina-positivas en animales WT, PS1 (no mostrado) y PS1xAPP a la edad de 6 meses (n=4). El estudio cualitativo al microscopio mostró una distribución específica de cada tipo neuronal coincidente con la bibliografía. Como se muestra para el animal WT de 6 meses de edad (Fig. 3.24 A), se apreció la existencia de algunas células Cajal-Retzius en la capa I de la corteza, una gran abundancia de neuronas piramidales positivas para reelina en la capa II y una menor densidad en el resto de las capas. En el animal doble transgénico (Fig. 3.24 B) no se apreciaron diferencias considerables en la morfología y distribución de las células reelina-positivas (ver imágenes de detalle A1 y B1), a excepción de la aparición de algunas neuritas distróficas positivas para este marcador (flechas) coincidente con la bibliografía existente (Knuesel y col., 2007).

La posterior cuantificación de la densidad celular (células/mm³) mediante métodos estereológicos (Fig. 3.24 C) demostró que no existían diferencias significativas en el número de neuronas que expresaban reelina entre los animales control WT y PS1 (no mostrado) y los doble transgénicos PS1xAPP a la edad de 6 meses en las capas I (Cajal Retzius, principalmente), II (neuronas principales) ni III-VI (subgrupo de neuronas piramidales y no piramidales minoritarias) de la corteza entorrinal, así como tampoco existían diferencias significativas al observar la totalidad de neuronas reelina-positivas de la corteza entorrinal (T de Student, $p > 0,05$, n=4).

Además, analizamos los niveles del ARNm para reelina en muestras microdiseccionadas con láser de la corteza entorrinal de animales WT, PS1 y PS1xAPP de 4 y 6 meses de edad. Los resultados revelaron que no existían diferencias significativas entre los genotipo estudiados a estas edades, sin embargo los valores de los animales PS1xAPP de 6 meses eran más altos que la media de los controles de la misma edad y en comparación con los animales PS1xAPP de 4 meses de edad, aunque no era significativo a esta edad.

Finalmente, quisimos analizar el proceso neurodegenerativo de las células principales a lo largo del envejecimiento, aunque sólo fuera a nivel cualitativo. Para ello empleamos el marcador NeuN, analizando los animales WT, PS1 (no mostrado) y PS1xAPP a 2, 4, 6, 12 y 18 meses de edad. Como puede observarse en las imágenes de microscopía convencional (Fig. 3.25), no existían diferencias apreciables en la morfología, distribución o densidad neuronal entre los animales WT y PS1xAPP a 2 y 4 meses de edad, mientras que, a la edad de 6 meses, podía apreciarse una disminución muy importante en las capas profundas de la corteza entorrinal en comparación con el animal control, principalmente en capa V, como era de esperar por los resultados anteriores. Incluso, parecían existir diferencias en la laminación, debido, posiblemente, a la presencia de las placas amiloide que se concentran, principalmente, en las capas profundas de la corteza entorrinal (asteriscos). Esta pérdida neuronal selectiva de las capas profundas se produce, como acabamos de ver, tanto en neuronas GABAérgicas (SOM, NPY y CR positivas) como en neuronas principales. El proceso neurodegenerativo de las capas profundas de la corteza

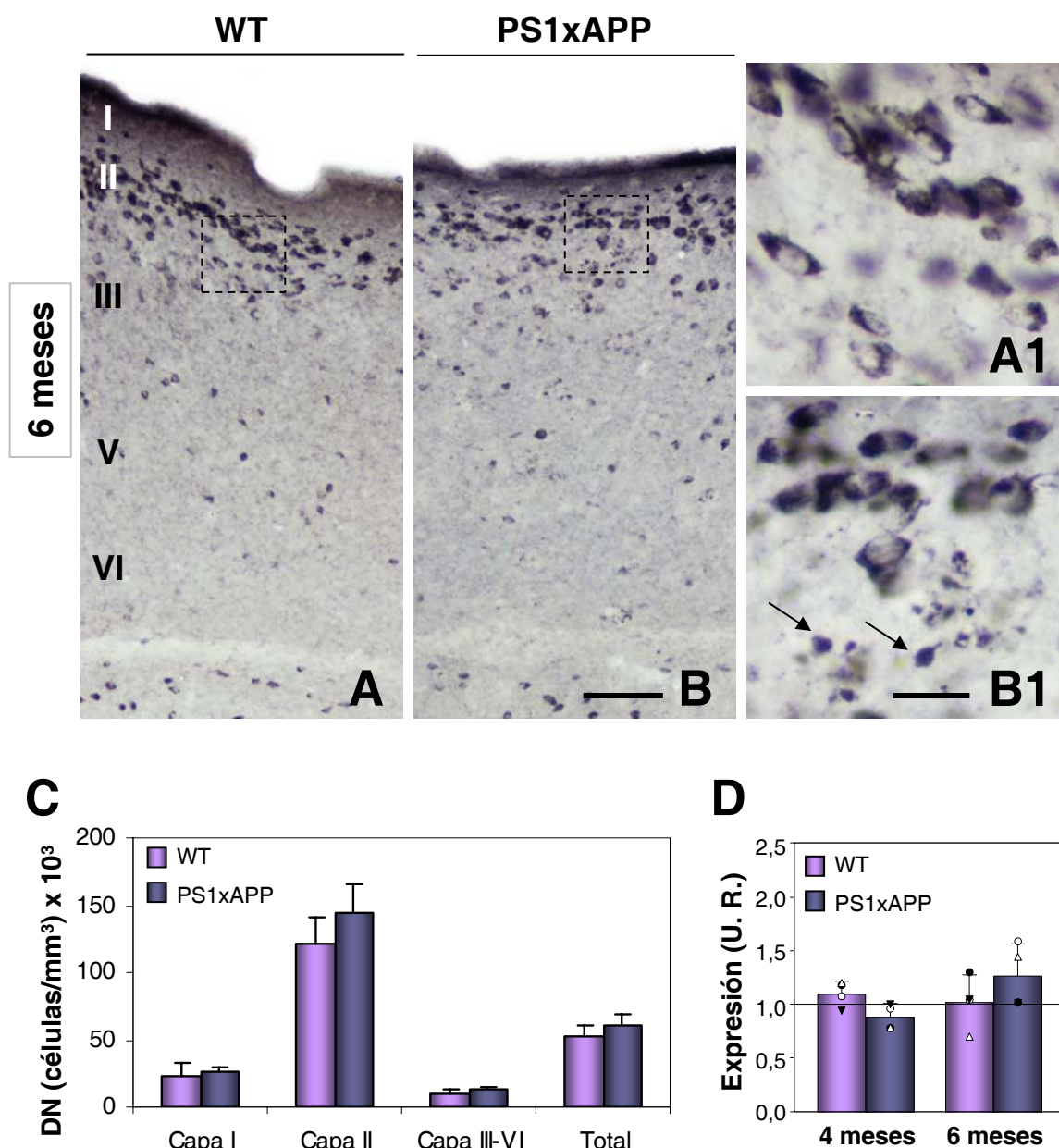


Figura 3.24. Estudio de las neuronas que expresan Reelina en la corteza entorrinal. A-B) Inmunohistoquímica para Reelina en animales WT (A y A1) y PS1xAPP (B y B1) de 6 meses de edad. La expresión de Reelina se concentra, mayoritariamente, en neuronas de capa II (neuronas principales) y en menor medida en capa III, aunque también existen algunas neuronas positivas en capa I (células Cajal-Retzius) y neuronas pequeñas dispersas por capas profundas (interneuronas). La distribución, morfología (ver A1 y B1) y el número de células inmunopositivas fue similar entre los animales WT (A) y PS1xAPP (B), aunque en los transgénicos existen algunas neuritas distróficas positivas (flechas en B1). C) Estudio estereológico cuantitativo de neuronas Reelina-positivas a los 6 meses de edad. No existen cambios significativos en la densidad numérica (DN) para esta población, ni en su totalidad ni por capas entre los PS1xAPP y los WT. D) Estudio de la expresión del ARNm de Reelina mediante RT-PCR a 4 y 6 meses de edad. No se detectan cambios en el nivel de expresión del ARNm entre los animales WT y PS1xAPP a ninguna de las dos edades analizadas. U. R.: unidades relativas. Barras de escala: 100 μ m (A y B); detalles: 20 μ m. n=4, T de Student, $p > 0,05$.

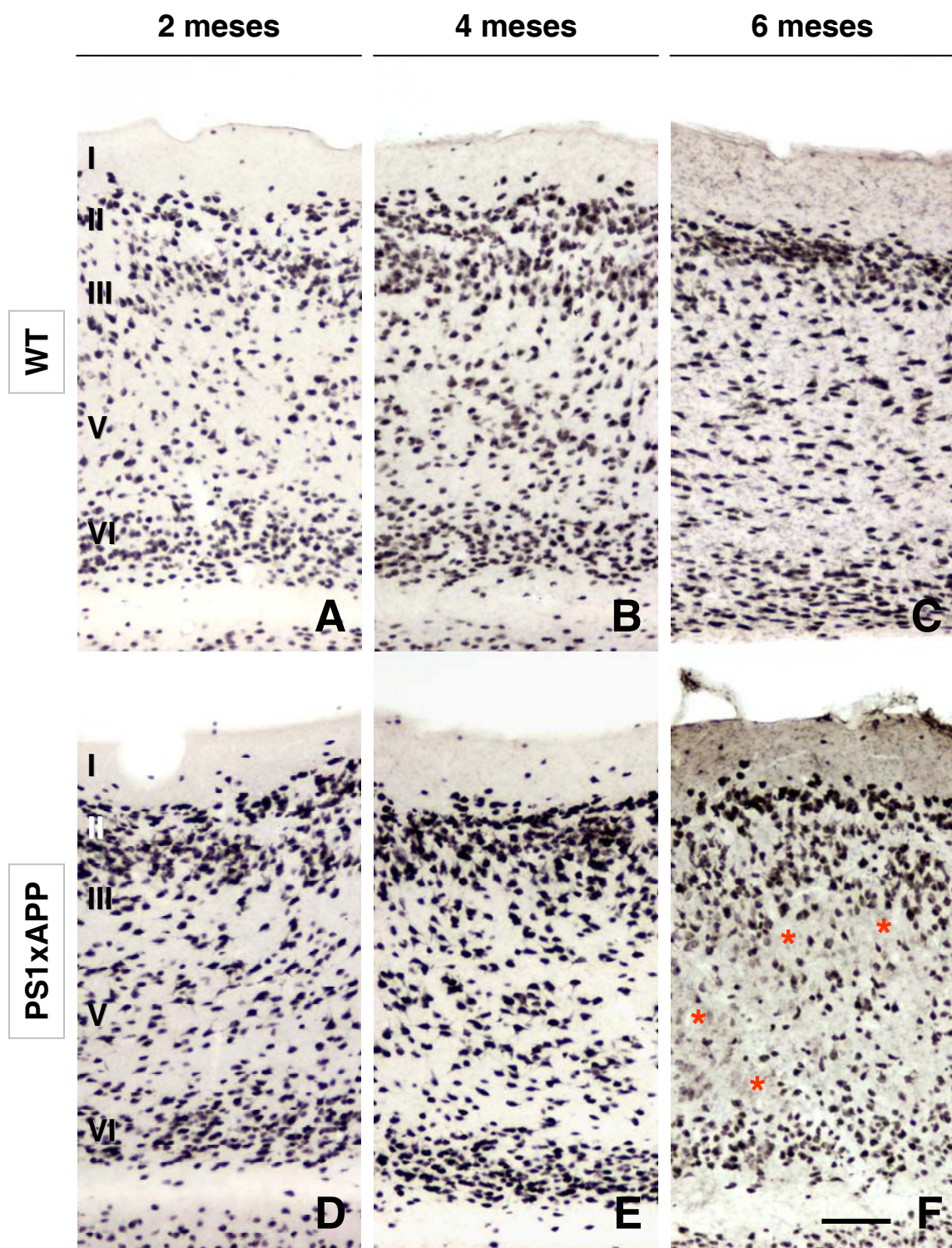


Figura 3.25. Estudio de la pérdida neuronal selectiva en las capas profundas de la corteza entorrinal. Inmunohistoquímica para NeuN en la corteza entorrinal de animales WT (A-C) y PS1xAPP (D-F) de 2 (A y D), 4 (B y E) y 6 (C y F) meses de edad. El marcaje con NeuN permite reconocer la población neuronal en general a lo largo de la columna cortical. A los 2 y 4 meses de edad, no se aprecian diferencias entre los animales control WT (A y B) y los doble transgénicos PS1xAPP (D y E). Sin embargo, a los 6 meses se aprecia una disminución de la densidad neuronal en las capas profundas de los animales PS1xAPP, coincidente con la aparición de las placas amiloides (asteriscos; F) en comparación con el control de la misma edad (C), mientras que las capas superficiales no parecen estar afectadas. Barra de escala: 100 μ m (A-F).

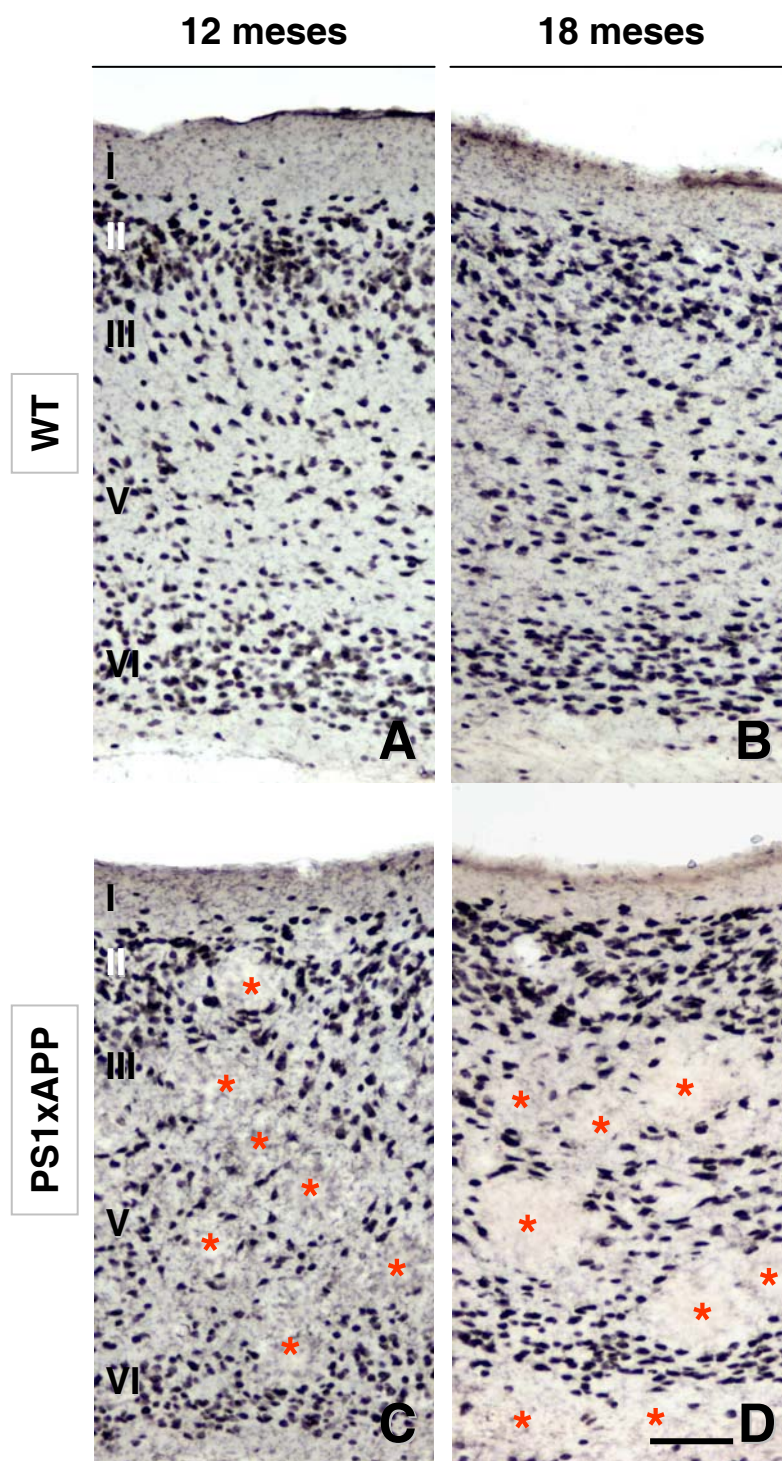


Figura 3.26. Estudio de la pérdida neuronal selectiva en las capas profundas de la corteza entorrinal. Inmunohistoquímica para NeuN en la corteza entorrinal de animales WT (A y B) PS1xAPP (C y D) de 12 (A y C) y 18 (B y D) meses de edad. En los animales PS1xAPP de edades avanzadas (C y D), en comparación con los controles de la misma edad (A y B), las células NeuN-positivas de las capas profundas son mucho más escasas, mientras que las de capas superficiales parecen mantenerse sin apenas cambios apreciables. Además, las neuronas de capas profundas de los animales PS1xAPP muestran una laminación alterada por la existencia de gran cantidad de depósitos de A β inmunonegativos para NeuN (asteriscos). Barra de escala: 100 μ m (A-D).

entorrinal se continuaba o mantenía en el tiempo, como se puede apreciar a la edad de 12 y 18 meses en los animales PS1xAPP (Fig. 3.26). En los animales transgénicos de edades avanzadas, en comparación con los controles de la misma edad, las células NeuN-positivas de las capas profundas eran mucho más escasas, mientras que las de capas superficiales se mantenían sin apenas cambios apreciables.

3.1.2.2. Disminución en la expresión de factores pro-supervivencia y aumento de factores pro-apoptóticos en la corteza entorrinal del modelo PS1xAPP a edades tempranas

Teniendo en cuenta la neurodegeneración temprana que tiene lugar en la corteza entorrinal de este modelo PS1xAPP, decidimos analizar si existía una disminución en la expresión de factores pro-supervivencia y/o aumento de la expresión de factores pro-apoptóticos que justificara esta muerte neuronal. En primer lugar hemos analizado los factores pro-supervivencia Lifeguard y FAIM_L.

Lifeguard es considerado un factor pro-supervivencia capaz de inhibir la apoptosis mediada por Fas, aunque no por otros receptores de la familia del factor de necrosis tumoral. Aunque no se conoce el mecanismo exacto de acción, se piensa que puede interactuar con Fas o a nivel del complejo Fas/FADD, sin afectar a la unión ni a la interacción de FasL con su receptor (Somia y col., 1999; Fernandez y col., 2007). Se analizó la expresión a nivel de ARNm de este factor en la corteza entorrinal para saber si sus niveles estaban disminuidos en los animales doble transgénicos. Para ello, realizamos un análisis mediante RT-PCR en muestras microdisseccionadas por láser de la corteza entorrinal de animales de 4 y 6 meses de edad (Fig. 3.27 A). Este estudio reveló una disminución significativa del $45,68 \pm 19,72\%$ (Tukey $p < 0,001$) en los animales PS1xAPP de 6 meses respecto a los controles de la misma edad.

Por otro lado, FAIM_L o “molécula inhibidora de la apoptosis mediada por Fas en su forma larga” es un antagonista del receptor de muerte Fas, de menor afinidad que su ligando específico FasL. La unión de FAIM_L al receptor de muerte Fas evita la inducción de la apoptosis vía caspasa-8. Además, es capaz de competir con FADD y silenciar el dominio de muerte de los receptores Fas y TNFR1, evitando así el inicio del proceso apoptótico (Segura y col., 2007), por lo que la disminución de sus niveles puede favorecer o acelerar el proceso apoptótico. El estudio mediante RT-PCR (Fig. 3.27 B) reveló que no existían diferencias significativas en los niveles de ARNm para FAIM_L entre los animales control y los PS1xAPP a los 4 meses de edad, mientras que, a los 6 meses, existía una reducción del $37,12 \pm 14,50\%$ (Tukey, $p < 0,01$; $n=4$) en los animales PS1xAPP respecto a los controles de la misma edad. Esta disminución coincidía temporalmente, como hemos comentado anteriormente, con la existencia de un proceso neurodegenerativo prominente en los animales PS1xAPP entre los 4 y los 6 meses de edad en la corteza entorrinal. Posteriormente, realizamos una inmunohistoquímica a 2, 6 y 18 meses de edad en animales WT y PS1xAPP empleando un anticuerpo específico para anticuerpo anti-FAIM_L (Fig. 3.28). Como puede apreciarse en las imágenes de microscopía convencional, FAIM_L se expresaba, a los 2 meses de edad, tanto en los animales control como en los doble

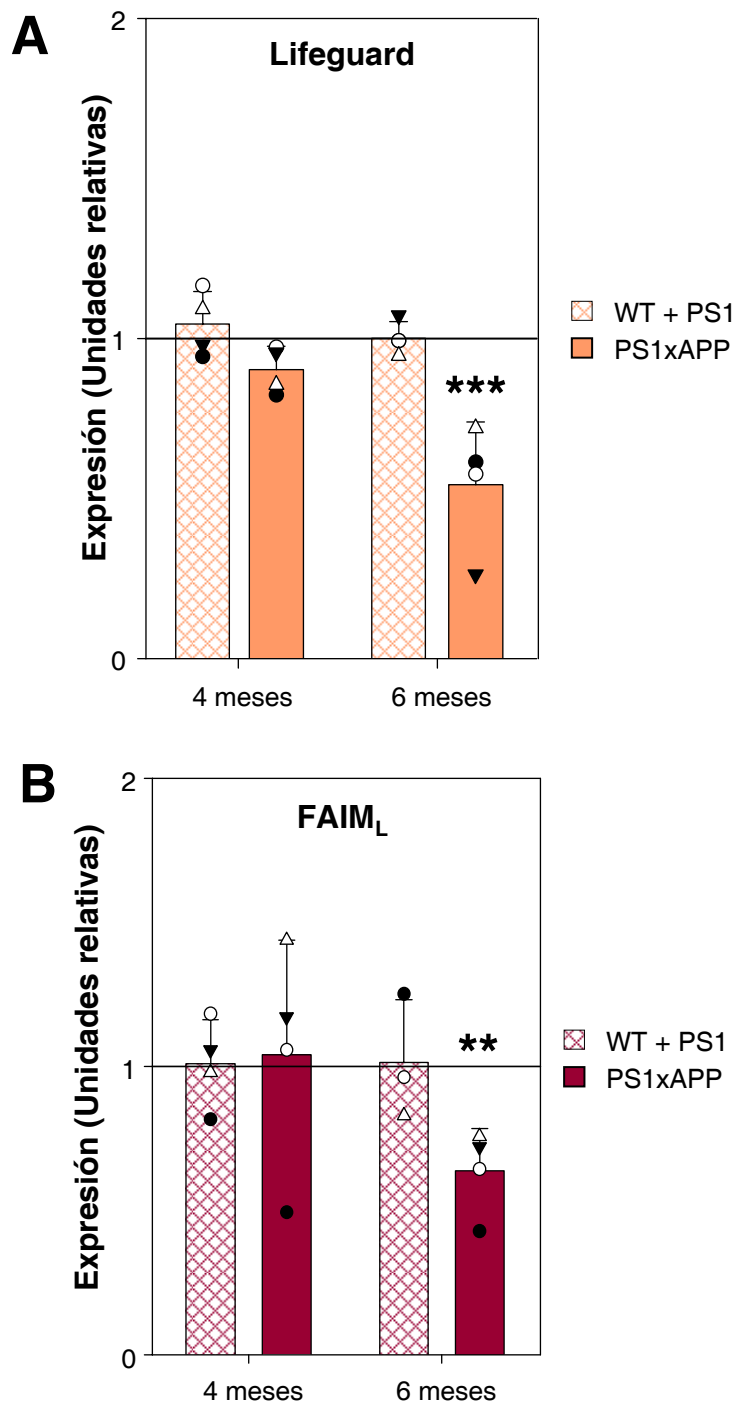


Figura 3.27. Cuantificación mediante RT-PCR del ARNm de los factores pro-supervivencia Lifeguard (A) y FAIM_L (B) en la corteza entorrinal de animales WT, PS1 y PS1xAPP de 4 y 6 meses de edad. Tanto Lifeguard como FAIM_L son capaces de regular el receptor de muerte Fas, bloqueándolo y evitando el proceso de apoptosis, por lo que son considerados como factores pro-supervivencia. La cuantificación mediante RT-PCR en corteza entorrinal microdisecada por láser muestra una disminución significativa para Lifeguard ($45,68 \pm 19,72\%$; ADEVA $F(3,12)=14,46$ $p<0,001$; Tukey $p<0,001$) y FAIM_L ($37,12 \pm 14,50\%$; ADEVA $F(3,10)=6,98$ $p=0,008$; Tukey $p=0,006$) de los niveles de ARNm en los animales PS1xAPP a los 6 meses de edad en comparación con los control WT y PS1, mientras que a 4 meses no existen diferencias significativas entre los genotipos. $n=4$; ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

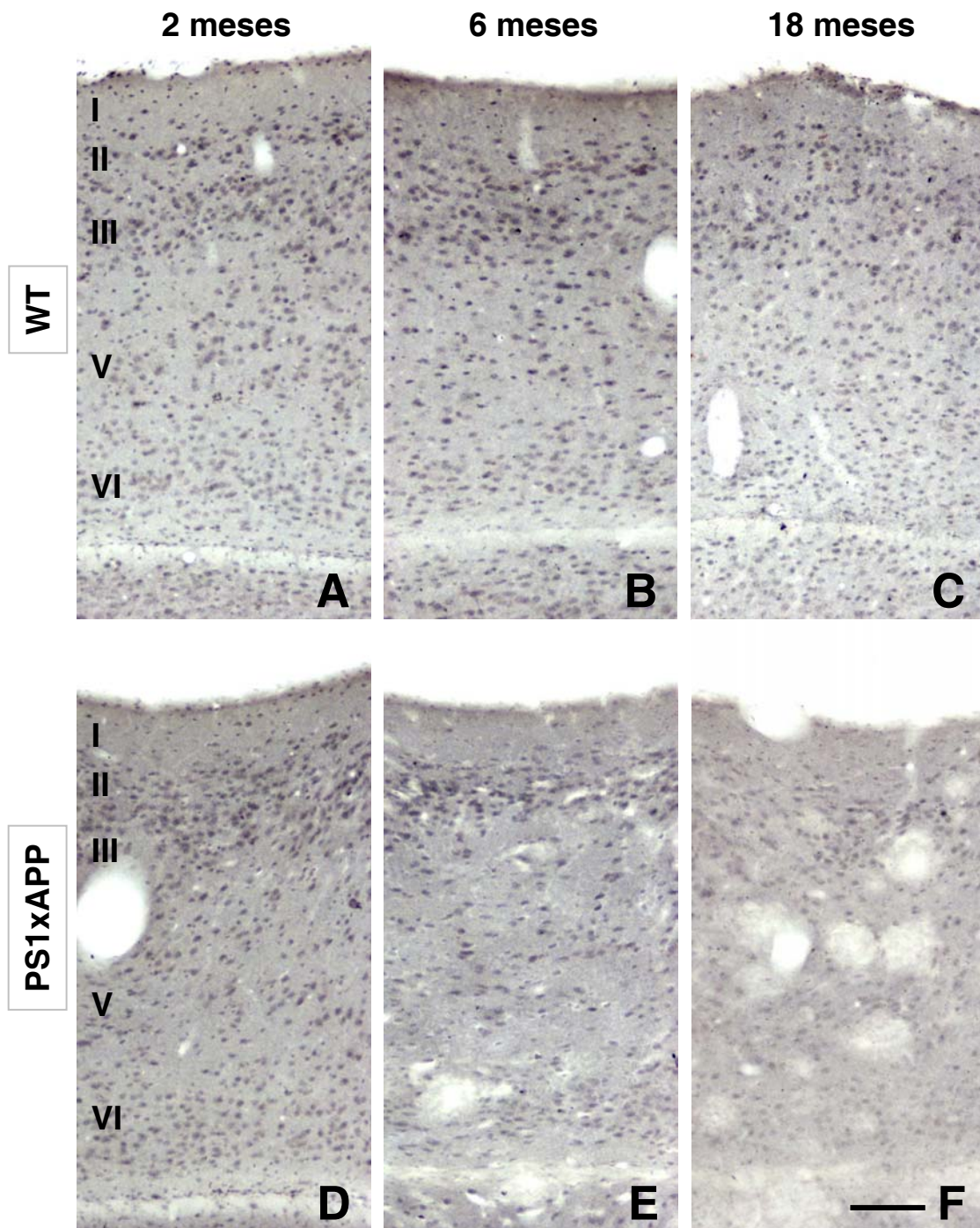


Figura 3.28. Inmunohistoquímica para FAIM_L en la corteza entorrinal lateral de animales WT (A-C) y PS1xAPP (D-F) de 2 (A y D), 6 (B y E) y 18 (C y F) meses de edad. La inmunorreactividad para FAIM_L se localiza en los cuerpos neuronales (núcleos y citoplasma) a lo largo de toda la columna cortical. En los animales WT no existen variaciones apreciables de este inmunomarcaje a las distintas edades analizadas, mientras que en los animales PS1xAPP el número de las neuronas FAIM_L-positivas parece ir en disminución con la edad (sobre todo en capas profundas) e, incluso, parece disminuir la intensidad del marcaje, siendo a los 18 meses de edad muy tenue en comparación con los animales control. Barra de escala: 100 μ m.

transgénicos, principalmente en los núcleos neuronales (y débilmente en el citoplasma) de todas las láminas de la corteza entorrinal. A la edad de 6 meses, y como era de esperar, se observó, en los animales PS1xAPP una notable disminución de la inmunorreactividad para este factor pro-supervivencia específicamente en las capas profundas de la corteza entorrinal, mientras que en los animales WT no se observaron diferencias entre las capas superficiales y profundas. Finalmente, a los 18 meses de edad, la diferencia entre los animales transgénicos PS1xAPP y control WT fue aún más acentuada. La expresión de FAIM_L apenas fue visible en las capas profundas de la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP. Sin embargo, en los animales WT las neuronas de capas superficiales y profundas mostraban una fuerte inmunorreactividad para este factor pro-supervivencia.

Por lo tanto, a edades tempranas, y coincidente con la muerte de neuronas en la corteza entorrinal, existe una disminución significativa de dos factores pro-supervivencia como son Lifeguard y FAIM_L. Además, la disminución de FAIM_L, analizada también a nivel inmunohistoquímico, reveló que esta disminución ocurría preferentemente en capas profundas, donde hemos observado que tiene lugar la pérdida mayoritaria de neuronas.

A continuación, se estudiaron varios marcadores de neurodegeneración y apoptosis, como son el Fluorojade B, Bim y Caspasa-3 activada. El proceso de apoptosis es complicado de analizar, ya que se trata de una fase relativamente corta en el tiempo y difícilmente observable, a menos que se trate de una muerte masiva, como puede ser el caso de una isquemia inducida experimentalmente. Los estudios con Fluorojade B (fluorocromo que se une a neuronas en degeneración) no dieron resultados concluyentes (no mostrados). Sólo aparecían marcadas las placas de amiloide y alguna célula glial, pero no neuronas.

Bim es un factor que interviene directamente inhibiendo a una de las moléculas anti-apoptóticas más importantes, Bcl-2, y es activado por la existencia de un estímulo de muerte proveniente del exterior celular. Un incremento en Bim indica que la ruta pro-supervivencia está siendo inhibida a favor de la activación de la ruta pro-apoptótica, por lo que se produce un desbalance del control mitocondrial de la apoptosis. Con técnicas inmunohistoquímicas se comprobó que existía mayor expresión de Bim a los 4 meses de edad en los animales PS1xAPP en comparación con los controles (Fig. 3.29 A-B), de forma más intensa en las capas profundas de la corteza entorrinal y, aparentemente, alrededor de las placas amiloides (ver detalle en B1), aunque también existía un gran marcaje del neuropilo en toda la columna cortical en comparación con el animal control, algo más intenso en la capa V y en la cápsula externa. Con una contratinción, empleando rojo congo para marcar las formas fibrilares de los depósitos de A β , se demostró que el marcaje para Bim se producía en los alrededores de las placas (Fig. 3.29 D), existiendo a los 6 meses de edad un marcaje más intenso que a los 4 meses, ya que el número de depósitos también aumentaba (ver detalle en D1). Los resultados obtenidos mediante RT-PCR de muestras microdiseccionadas con láser de la corteza entorrinal en animales PS1xAPP (Fig. 3.29 E), mostraron diferencias significativas entre los grupos, con un aumento de la expresión del factor Bim a los 4 meses de edad ($193,52 \pm 141,08\%$; Tukey, $p < 0,05$; $n=4$), en comparación con los animales control.

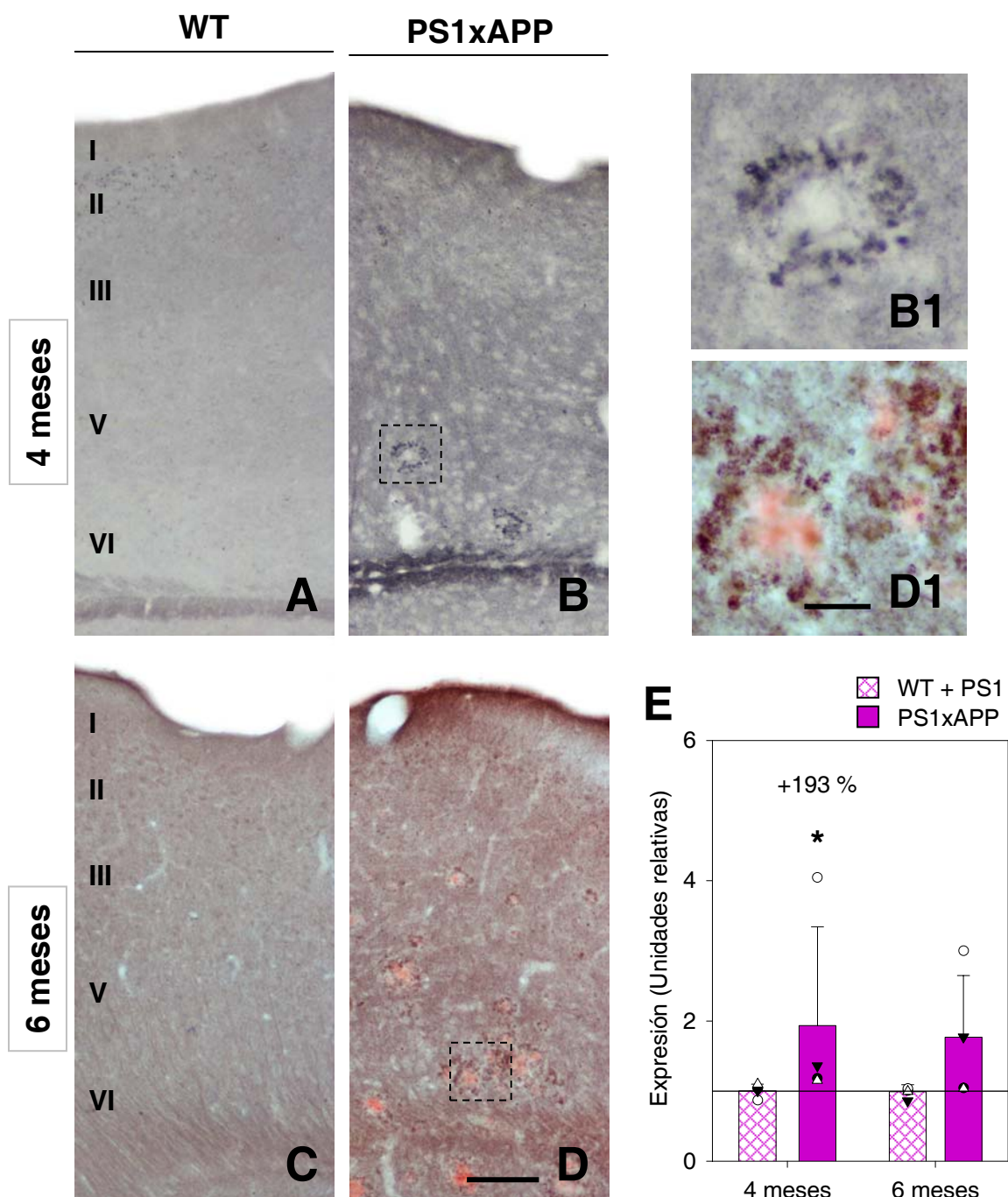


Figura 3.29. A-D) Inmunohistoquímica para Bim en la corteza entorrinal de animales WT (A y C) y PS1xAPP (B, B1, D y D1) de 4 (A y B) y 6 (C y D) meses de edad. La inmunotinción para Bim es más intensa a nivel de neuropilo en los animales doble transgénicos a ambas edades en comparación con los controles. Además, existen estructuras punteadas inmunorreactivas alrededor de las placas de amilode (ver detalles en B1 y D1). C, D, y D1 tienen contra-tinción de rojo congo. Barras de escala: 100 μ m (A-D); 20 μ m (B1 y D1). E) **Cuantificación mediante RT-PCR del ARNm para Bim en corteza entorrinal a 4 y 6 meses de edad.** La medida de los niveles de ARNm para Bim en los animales PS1xAPP mostró un incremento significativo a 4 meses de edad (+193,52 $\pm$ 141,08%) en comparación con los animales WT y PS1 de la misma edad. n=4; ADEVA de una vía, $p < 0,05$; Tukey $p < 0,05$. * $p < 0,05$.

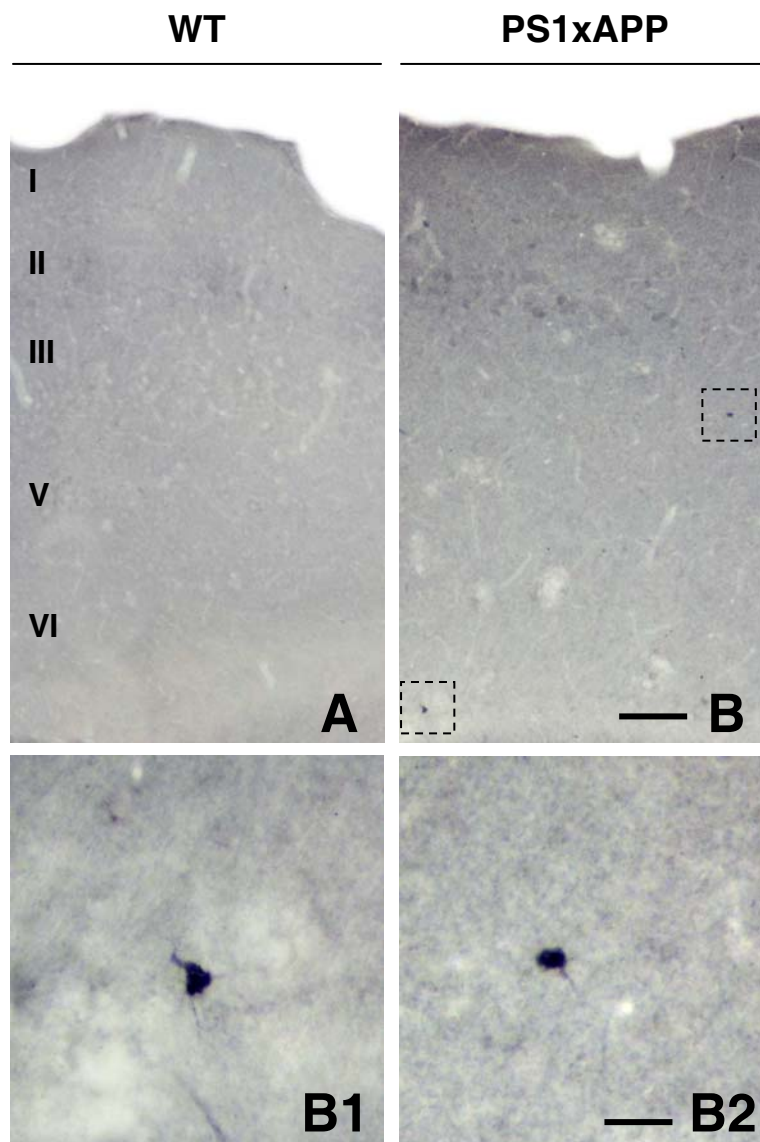


Figura 3.30. Inmunohistoquímica para Caspasa-3 activada en la corteza entorrinal de animales WT (A) y PS1xAPP (B, B1 y B2) a 6 meses de edad. Las imágenes de microscopía muestran algunas células de la corteza entorrinal inmunomarcadas con el anticuerpo contra caspasa-3 activada en los animales PS1xAPP, mientras que no se detectan células inmunorreactivas en los animales control. Las célula inmunoteñidas tienen morfología neuronal (B1 y B2). Barras de escala: 100 μ m (A y B); 20 μ m (B1 y B2).

Otro marcador de apoptosis empleado fue el anticuerpo contra la caspasa-3 en su forma activada. La caspasa-3 es un ejecutor crítico de la apoptosis, ya que es uno de los últimos pasos de la vía de las caspasas y puede ser activada por diversas rutas, mediante caspasa-8, -9, -10, -12 u otros inductores. La inmunohistoquímica para la caspasa-3 activada mostró marcaje específico en células con morfología neuronal en las capas profundas de la corteza entorrinal en animales PS1xAPP, mientras que en los animales control no se observó ninguna marca en las secciones analizadas (Fig. 30 A-B).

3.1.3. Neuritas distróficas

3.1.3.1. El proceso neurodegenerativo temprano va acompañado de la presencia de neuritas distróficas, fundamentalmente axones, de naturaleza GABAérgica y glutamatérgica

Como se ha comentado anteriormente en otros apartados, existen gran cantidad de neuritas distróficas en los animales PS1xAPP cuyo número aumenta con la edad. Las neuritas distróficas son dilataciones de los procesos neuronales, como son las dendritas y los axones, que adquieren una apariencia anormal y patológica, aumentando de grosor y sufriendo dilataciones en su estructura. La existencia de neuritas distróficas apoya la existencia de un proceso neurodegenerativo temprano en la corteza entorrinal de este modelo animal.

Para conocer la relación de las neuritas distróficas con los depósitos de A β , se realizaron varios estudios en animales doble transgénicos de 6 meses de edad, con distintos marcadores y una contratinción con rojo congo, que tiñe los depósitos extracelulares fibrilares. Para el marcador de APP aparecían multitud de neuritas distróficas (estructuras inmunorreactivas de apariencia punteada), de origen glutamatérgico (el transgén hAPP sólo se expresa en neuronas glutamatérgicas en nuestro modelo), alrededor de las placas extracelulares (Fig. 3.31 A). También se podían observar neuritas distróficas positivas para los neuropéptidos SOM y NPY asociadas a los depósitos de A β extracelular, por lo que las neuritas distróficas no sólo tenían naturaleza glutamatérgica, sino también GABAérgica, como era de esperar (Fig. 3.31 B y C, respectivamente). La sinaptofisina es un marcador de elementos presinápticos y también aparecían neuritas distróficas positivas para este marcador asociadas a los depósitos congofílicos (Fig. 3.31 D). El anticuerpo MAP2 para los procesos dendríticos, también marcó algunas estructuras dilatadas alrededor de la placas congofílicas, aunque no se apreciaban muy cercanos a la placa, (Fig. 3.31 E). El neurofilamento 160, marcador específico de axones, permitió determinar la existencia de axones distróficos en los alrededores de las placas amiloideas (Fig. 3.31 F).

La existencia de neuritas distróficas podía deberse, entre otros motivos, a fallos en el citoesqueleto de las neuronas relacionados con la aparición de la proteína tau hiperfosforilada, que provocaría fallos en el transporte axonal y distrofia. El anticuerpo AT8 es capaz de detectar pares de filamentos helicoidales formados por la proteína tau hiperfosforilada en Ser202 y Thr205, por lo que se empleó para realizar un estudio inmunohistoquímico en animales transgénicos PS1xAPP de 2, 4, 6, 12 y 18 meses de edad

(Fig. 3.32). A los 2 meses de edad no se encontró ningún marcaje inmunopositivo para el anticuerpo AT8 en los animales PS1xAPP, al igual que en los animales WT de distintas edades (no mostrados). A los 4 meses comenzaron a aparecer las primeras neuritas distróficas en la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP alrededor de los depósitos de A β . El número de neuritas distróficas inmunopositivas para la forma fosforilada de tau aumentó con la edad, no sólo porque existían más placas extracelulares, sino porque también la densidad de neuritas distróficas alrededor de cada placa aumentaba con la edad (ver imágenes de detalle).

3.1.4. Sinapsis

3.1.4.1. El proceso neurodegenerativo temprano en la corteza entorrinal va acompañado de cambios sinápticos

Tras el análisis de las poblaciones de interneuronas y de las neuronas principales, quisimos conocer, sólo de una forma preliminar, si existían alteraciones a nivel sináptico en los animales transgénicos a edades tempranas. Para ello, analizamos distintos marcadores sinápticos mediante RT-PCR, como son VGluT1 (para sinapsis de naturaleza glutamatérgicas), VGAT (para sinapsis de naturaleza GABAérgicas), sinaptofisina (marcador presináptico), drebrina (marcador dendrítico) y PSD95 (marcador postsináptico) (Fig. 3.33).

Los resultados mostraron que no existían diferencias significativas en ninguno de los marcadores estudiados a los 4 meses de edad entre los animales control y los doble transgénicos PS1xAPP. Sin embargo, a los 6 meses, se detectó una disminución significativa del $34,23 \pm 21,33\%$ (Tukey, $p < 0,05$, $n=4$) en el marcador VGAT en los PS1xAPP, por lo que había un déficit de las sinapsis realizadas por las interneuronas GABAérgicas, seguramente provocado por la neurodegeneración de éstas (SOM y NPY, principalmente). Para el ARNm de VGluT1 no se determinó la existencia de una reducción significativa, sin embargo, de los 4 individuos analizados, 3 tenían un valor inferior a los controles y, es posible que, con un mayor número de individuos o en estadios más avanzados, su disminución llegase a ser significativa. Los niveles del ARNm para sinaptofisina no se veían alterados a los 6 meses, mientras que los niveles de expresión de drebrina disminuían en 4 de los 4 casos analizados, aunque no fue significativo, indicio de que las dendritas podrían estar comenzando a sufrir daños tempranos, pero que posiblemente fueran más manifiestos a edades más avanzadas. Para el marcador de densidad postsináptica PSD95, no se produjo un cambio significativo a los 6 meses de edad en comparación con los niveles de ARNm de los controles. El aumento del tamaño muestral podría, posiblemente, hacer estas diferencias estadísticamente significativas.

Los estudios inmunohistoquímicos para VGluT1, VGAT y sinaptofisina (Fig. 3.34) apoyaban los resultados obtenidos en los estudios moleculares. A los 6 meses de edad, no existían diferencias apreciables en el inmunomarcaje con VGluT1 entre animales WT y PS1xAPP. Únicamente se podía observar una tinción algo más intensa en los animales WT y, en ocasiones aparecía una marcada inmunotinción alrededor de los depósitos

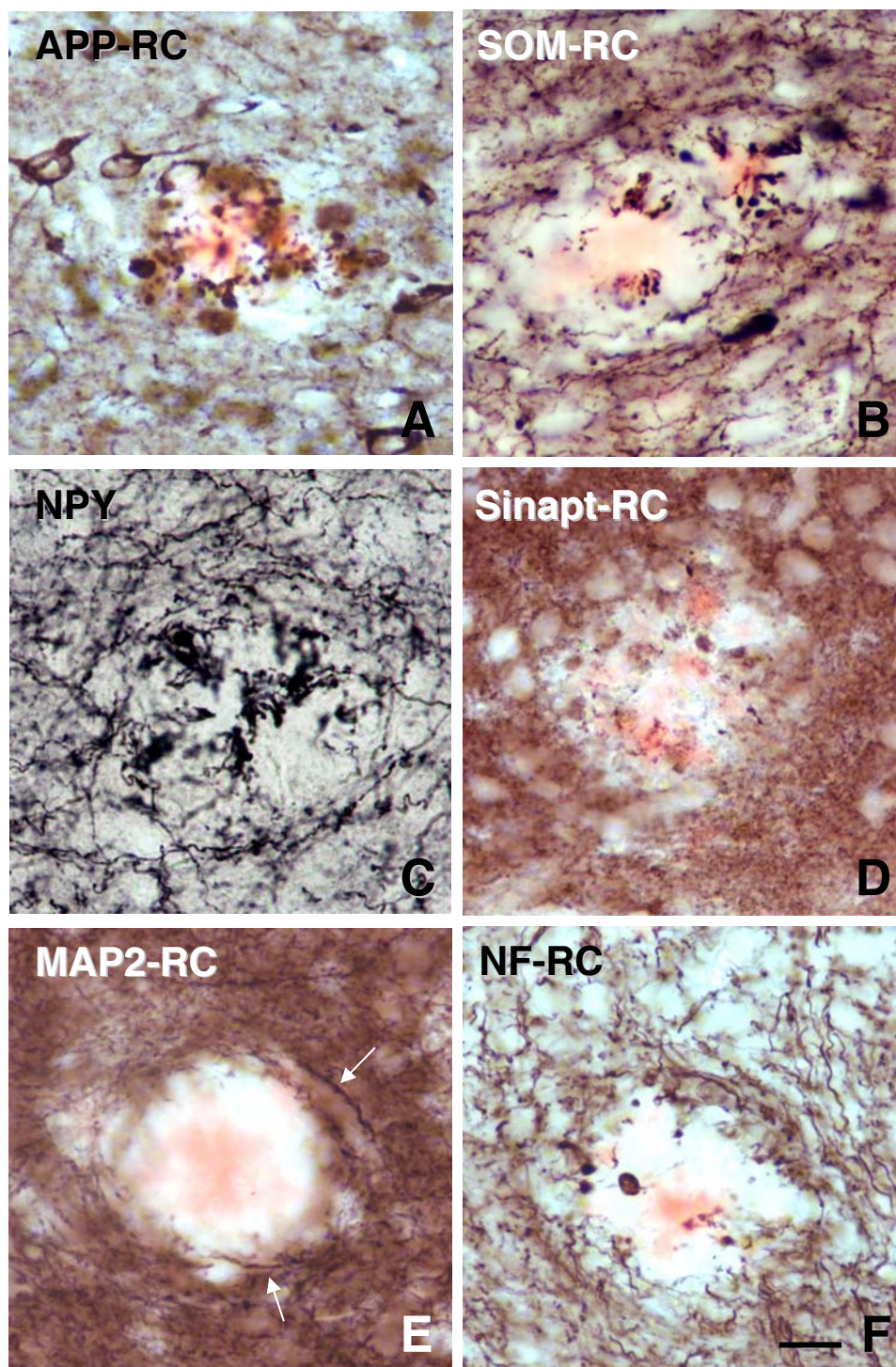


Figura 3.31. Neuritas distróficas marcadas con anticuerpos para hAPP (A), SOM (B), NPY (C), Sinaptofisina (D), MAP2 (E) o Neurofilamento-160 (F) en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 6 meses de edad. En las imágenes se muestra la existencia de neuritas distróficas en el modelo PS1xAPP alrededor de depósitos extracelulares congofílicos. Estas neuritas son positivas para APP (neuronas glutamatérgicas), para SOM y NPY (neuronas GABAérgicas), neurofilamento-160 (marcador axonal), sinaptofisina (marcador sináptico) y en menos medida para MAP2 (marcador de dendritas). Barra de escala: 20 μ m.

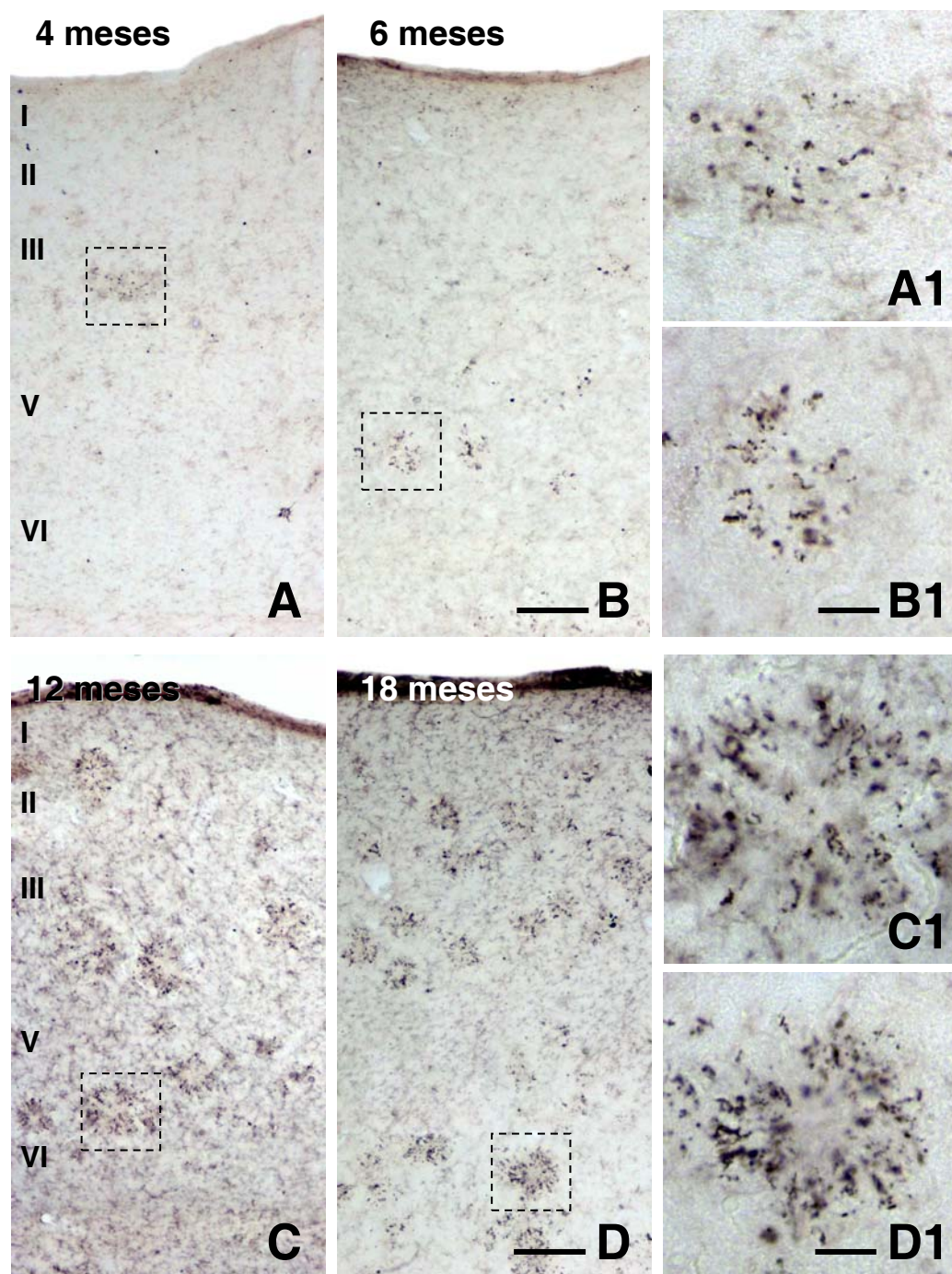


Figura 3.32. Presencia de neuritas distróficas inmunopositivas para AT8 en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP a 4 (A), 6 (B), 12 (C) y 18 (D) meses de edad. A los 4 meses comienzan a aparecer las primeras neuritas distróficas en la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP alrededor de los depósitos de A β . El número de neuritas distróficas inmunopositivas para la forma fosforilada de tau aumenta con la edad, no sólo porque existen más placas extracelulares, sino porque también la densidad de neuritas distróficas alrededor de cada placa parece aumentar (ver imágenes de detalle). Barras de escala: 100 μ m; detalles: 20 μ m.

extracelulares de A β en los animales PS1xAPP, debido a la existencia de neuritas distróficas inmunopositivas para este anticuerpo. Para VGAT, las imágenes mostraban una disminución en el inmunomarcaje a lo largo de la columna cortical de la corteza entorrinal en los animales PS1xAPP de 6 meses en comparación con los controles, muy aparente en las capas II y III, lo que significa que había una disminución en las aferencias GABAérgicas que llegaban a las neuronas principales de estas capas, por lo que estos datos inmunohistoquímicos concordaban con los obtenidos en los estudios moleculares mostrados anteriormente. Además, aparecían gran multitud de neuritas distróficas inmunorreactivas para el anticuerpo contra VGAT en forma de estructuras punteadas alrededor de las placas de A β en los animales PS1xAPP. Un patrón de inmunotinción similar al de VGluT1 se pudo observar para sinaptofisina, sin cambios aparentes y con algunas neuritas distróficas marcadas alrededor de las placas.

3.2. Progresión de la patología amiloidea en la corteza entorrinal del modelo PS1xAPP. Expresión extracelular e intracelular del β -amiloide

Otra de las marcas histopatológicas de la enfermedad de Alzheimer, posiblemente la más estudiada, es la aparición de depósitos extracelulares formados por la proteína A β . Se sabe que el A β es neurotóxico (al menos las formas oligoméricas), por lo que en el segundo objetivo de este trabajo nos centramos en el análisis de las diferentes formas del A β tanto extra- como intracelular en la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP, para conocer su posible implicación en los procesos neurodegenerativos en nuestro modelo PS1xAPP.

3.2.1. Las neuronas principales de la corteza entorrinal, excepto las de capa V, expresan la forma humana mutada de la proteína APP en el modelo PS1xAPP

Los animales doble transgénicos PS1xAPP empleados en el presente trabajo expresan la forma mutada de la presenilina 1, al igual que los simple transgénicos PS1, bajo el control del promotor HMGC α -reductasa (enzima productora de colesterol sobre la que actúan las estatinas). Además, expresan la proteína humana APP con la doble mutación, 'Swedish' y 'London', bajo el promotor Thy1, altamente expresado en las neuronas principales de la corteza cerebral y el hipocampo. La actuación de la enzima BACE y PS1 del complejo γ -secretasa sobre la APP genera la formación del péptido A β (ver apartado 1.2.2 de la Introducción).

Para analizar cuáles podrían ser las causas de la neurodegeneración que sufren de forma específica algunas subpoblaciones neuronales en este modelo, el primer paso fue analizar la expresión de los transgenes insertados que portan las mutaciones humanas. El anticuerpo empleado contra APP reconoce de forma específica el extremo C-terminal de la proteína tanto humana como murina.

El estudio del patrón de expresión temporal de APP mediante inmunohistoquímica reveló la expresión de la proteína APP a lo largo de toda la columna de la corteza entorrinal, con un marcaje intracelular o de membrana. A los 2 y 4 meses de edad (Fig. 3.35), se

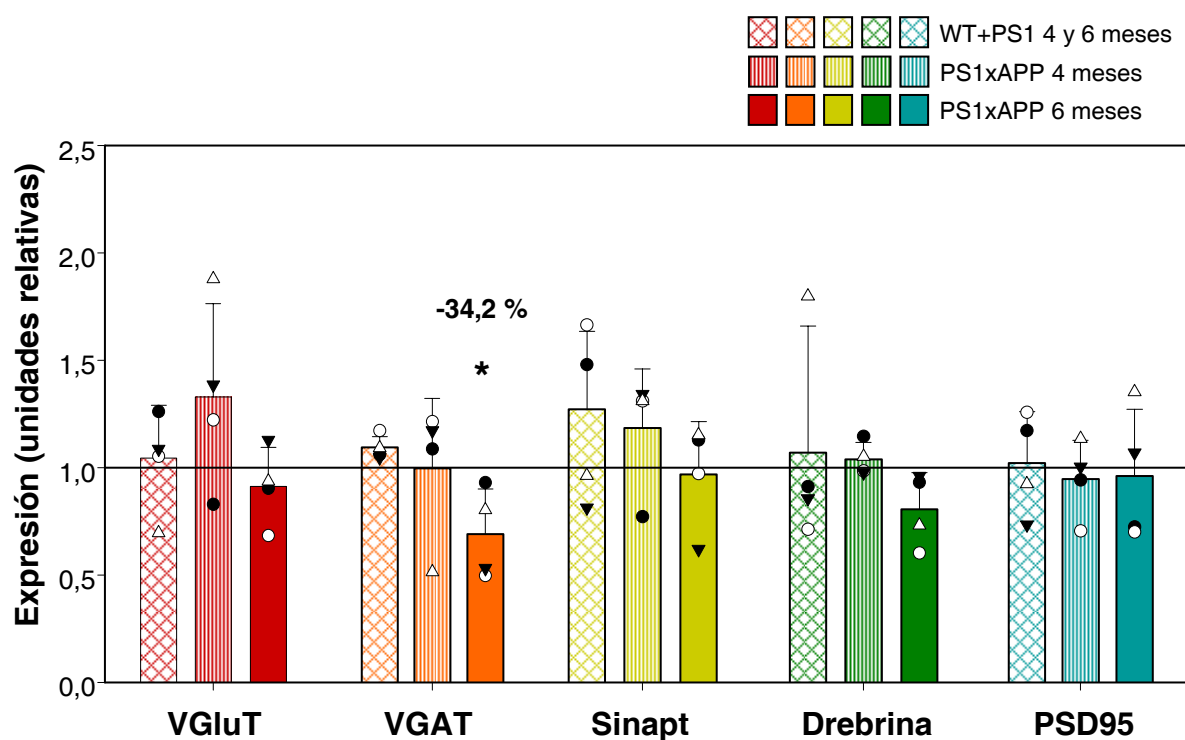


Figura 3.33. Expresión de los niveles de ARNm para diversos marcadores sinápticos en corteza entorrinal microdiseccionada por láser de animales PS1xAPP, PS1 y WT a 4 y 6 meses de edad. Se han analizado los marcadores sinápticos VGluT, VGAT, sinaptofisina, drebrina y PSD95. A los 4 meses no se detectan cambios en ninguno de estos marcadores. Sin embargo, a los 6 meses de edad, existe una disminución significativa en los niveles de ARNm de VGAT en los animales PS1xAPP respecto a los controles WT/PS1 (ADEVA de una vía, $F(2,11)=4,78$, $p<0,05$. Tukey $p<0,05$). Para los demás marcadores existe una tendencia a la disminución en la media de los valores a 6 meses, aunque no llega a ser significativa. $n=4$; * $p<0,05$.

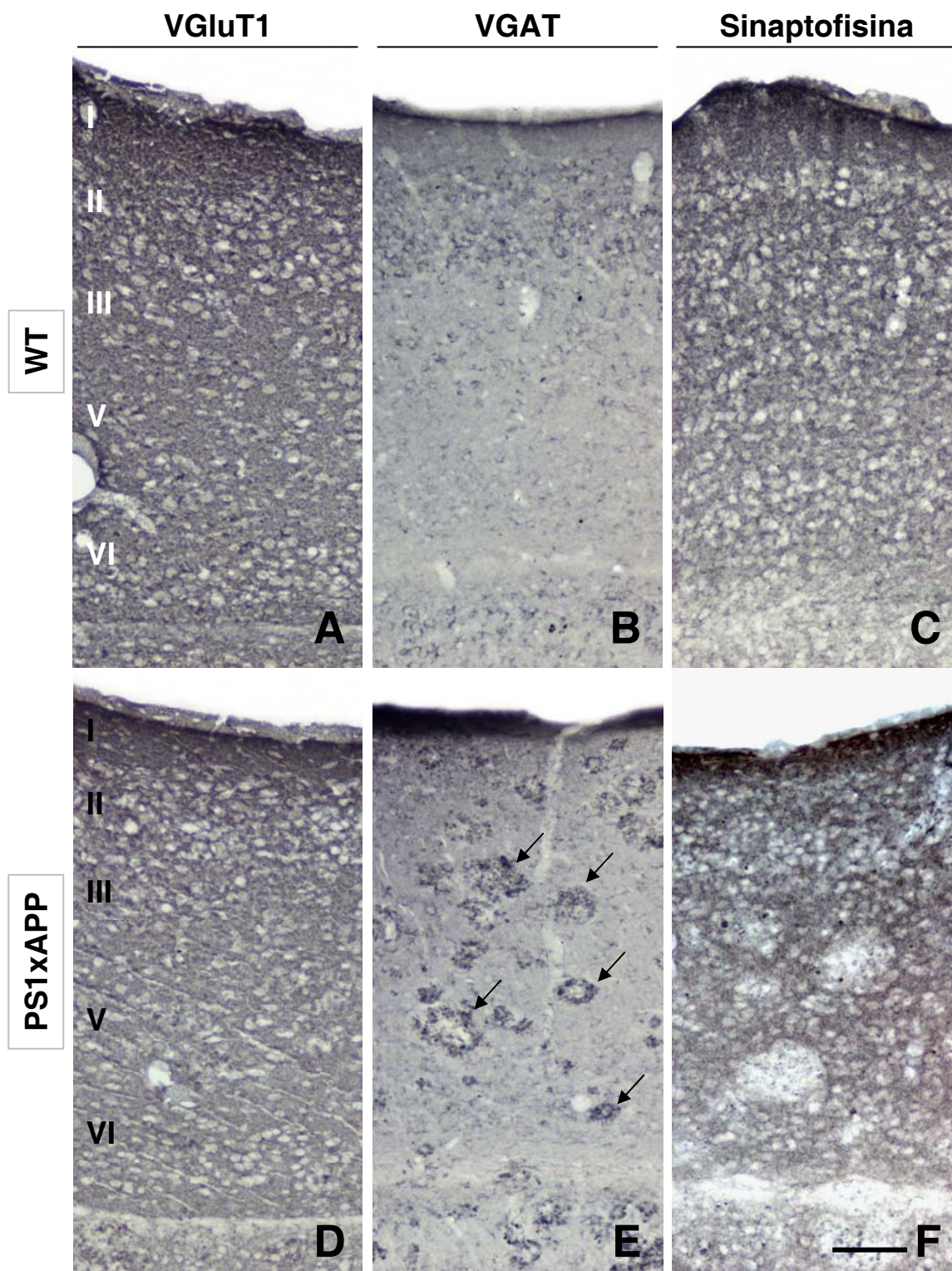


Figura 3.34. Inmunohistoquímica para los marcadores sinápticos VGLUT1 (A y D), VGAT (B y E) y sinaptofisina (C y F) en la corteza entorrinal de animales WT (A-C) y PS1xAPP (D-F) de 6 meses de edad. Las imágenes muestran que apenas existen diferencias en el patrón o intensidad de expresión del transportador de glutamato VGLUT1 entre los animales WT y PS1xAPP, mientras que para el transportador GABA, VGAT, se observa un cambio cualitativo en su patrón de expresión en los animales PS1xAPP, apareciendo numerosas neuritas distróficas inmunomarcadas alrededor de las placas (flechas). Para el marcador general sinaptofisina, no se observan cambios significativos entre ambos genotipos, exceptuando las zonas inmunonegativas correspondientes a las placa amiloides. Barra de escala: 100 μ m.

observó que en los animales control PS1 y WT el inmunomarcaje era mucho menos acusado que en el doble transgénicos PS1xAPP (no se ha modificado ni el brillo ni el contraste de las imágenes y los cortes fueron procesados a la vez). El marcaje que aparecía en los animales control se debía al reconocimiento, por parte del anticuerpo, del APP endógeno murino, mientras que en los animales PS1xAPP reconocía tanto el APP endógeno como el sobre-expresado por la inserción del transgén, de origen humano. El marcaje aparecía principalmente en las neuronas de capa II-III y en V y VI, donde se encuentran los somas de las neuronas principales, aunque en los animales PS1xAPP, aparentemente, no todas las neuronas principales de capa V eran positivas para hAPP, como se comentará más adelante. Además, existía un marcaje muy intenso del neuropilo en los animales doble transgénicos que no aparecía en los animales control y este patrón se repitió a lo largo del envejecimiento del animal. Es a los 4 meses de edad cuando comenzaron a apreciarse las primeras neuritas distróficas positivas para este marcador en las capas profundas de la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP (flechas). A los 6 meses de edad (Fig. 3.36), el marcaje continuó siendo más intenso en los animales doble transgénicos que en los controles, con un patrón similar al mencionado para las edades anteriores y aumentó el número de neuritas distróficas inmunopositivas para APP (flechas) en las capas profundas de la corteza entorrinal (ver inserto en C). A los 12 meses la tinción fue muy similar, más intensa en los animales PS1xAPP que en los controles y el número de neuritas distróficas positivas aumentó alrededor de los depósitos extracelulares. A los 18 meses de edad (Fig. 3.37 A-C), el patrón del inmunomarcaje se mantuvo similar al de 12 meses de edad. A esta edad fue también patente que en la capa I, la tinción parecía ser más intensa que en la misma capa de los animales control. En las imágenes de la Fig. 3.37 D y E, se puede observar con detalle el marcaje con hAPP, que aparecía en el soma de las neuronas (flechas blancas) y en las neuritas distróficas (flechas negras), repartidas en los alrededores de las placas de beta amiloide extracelulares (asteriscos), a 6 y 18 meses de edad.

Debido a que la mayoría de las neuronas de capa V de la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP apenas expresaban hAPP, realizamos un doble inmunomarcaje hAPP/NeuN a 4 meses de edad en los animales PS1xAPP para corroborar este resultado (Fig. 3.38). Las imágenes de microscopía de fluorescencia mostraron un intenso inmunomarcaje para hAPP en casi la totalidad de las neuronas NeuN-positivas de capa II y III de la corteza entorrinal. Aquellas que no contenían APP eran, casi con seguridad, interneuronas GABAérgicas. Un patrón similar se observó en la capa VI, donde la mayoría de las neuronas son principales. Tal y como se esperaba, la gran mayoría de las neuronas (NeuN-positivas) en la capa V de la corteza entorrinal no expresaban hAPP. Esto significaba que, a diferencia de lo que ocurre en las capas II, III y VI, la capa V se caracteriza por la ausencia de expresión de APP.

Para comprobar si este marcaje neuronal con hAPP se producía realmente sólo en neuronas principales, se realizó un doble marcaje con hAPP junto con un marcador de neuronas GABAérgicas (para interneuronas) como es el transportador vesicular de GABA (VGAT), así como junto a un marcador glutamatérgico (para neuronas principales), el

transportador vesicular de glutamato (VGluT1). Estos marcadores se localizan, preferentemente, en los terminales nerviosos, por lo que su presencia debe ser analizada en las neuritas distróficas (APP-positivas) de los animales PS1xAPP. Las imágenes para microscopía fluorescente confocal mostraron que no existía co-localización de hAPP con terminales GABAérgicos (Fig. 3.39 A), por lo que las interneuronas GABAérgicas no sobre-expresaban la forma humana del APP. Sin embargo, la co-localización sí fue positiva para hAPP/VGluT1 (Fig. 3.39 B), por lo que la proteína mutada humana APP se sobre-expresaba en las neuronas principales de naturaleza glutamatérgica, pero no en las interneuronas, como era de esperar.

3.2.2. Patrón de expresión temporal del β -amiloide extracelular en la corteza entorrinal. La formación de placas comienza desde edades muy tempranas y de forma preferente en las capas profundas

Una primera aproximación para averiguar las causas de la neurodegeneración selectiva de las neuronas de la corteza entorrinal en los animales PS1xAPP fue conocer el patrón de expresión temporal de los depósitos del péptido A β . Estos depósitos pueden ser marcados por diferentes anticuerpos y colorantes específicos, según la conformación espacial del A β (monómeros, oligómeros, fibrilar o total). Las imágenes que muestran los diferentes marcajes de A β corresponden a un mismo animal PS1xAPP en cada edad, por lo que se pueden comparar los distintos patrones de expresión dentro de un mismo individuo.

Para comenzar, se analizaron los depósitos extracelulares empleando el anticuerpo monoclonal **6E10**, que reconoce los primeros 17 aminoácidos del péptido amiloide (de 40-42 aminoácidos) humano (exógeno, procedente del transgén). Este anticuerpo reconoce el A β total, independientemente de su agregación en forma de monómeros, oligómeros o fibrilar, y, además, se une a la forma sin procesar del APP y a las ya procesadas. El inmunomarcaje con 6E10 (Fig. 3.40), no mostró depósitos extracelulares a los 2 meses de edad (sí aparece marcaje intracelular que se comentará más adelante). Sin embargo, a los 4 meses, se empezaron a observar las primeras placas extracelulares, principalmente en las capas profundas de la corteza entorrinal. No eran muy abundantes y su tamaño era pequeño. A los 6 meses, el número de placas marcadas aumentó, así como su tamaño. Algunas de ellas aparecían en capa III, pero no se observaban en las capas más superficiales. No fue hasta los 12 meses de edad cuando aparecieron placas inmunomarcadas en las capas superficiales de la corteza. Su número, inmunorreactividad y tamaño aumentaron de forma gradual y a los 18 meses de edad el patrón inmunorreactivo se mantuvo.

A continuación, se pasó a estudiar la distribución y el patrón temporal de las dos formas de A β mayoritarias, A β_{40} y A β_{42} . La primera se trata de un producto relativamente soluble, mientras que la segunda es más hidrofóbica, con gran poder de agregación, lo que le confiere mayor capacidad de formar agregados extracelulares. Además, la mutación *Swedish* aumenta la producción de A β_{42} . La expresión de ambas formas de A β se analizó mediante la utilización de anticuerpos específicos. El patrón de expresión de la forma **A β_{40}**

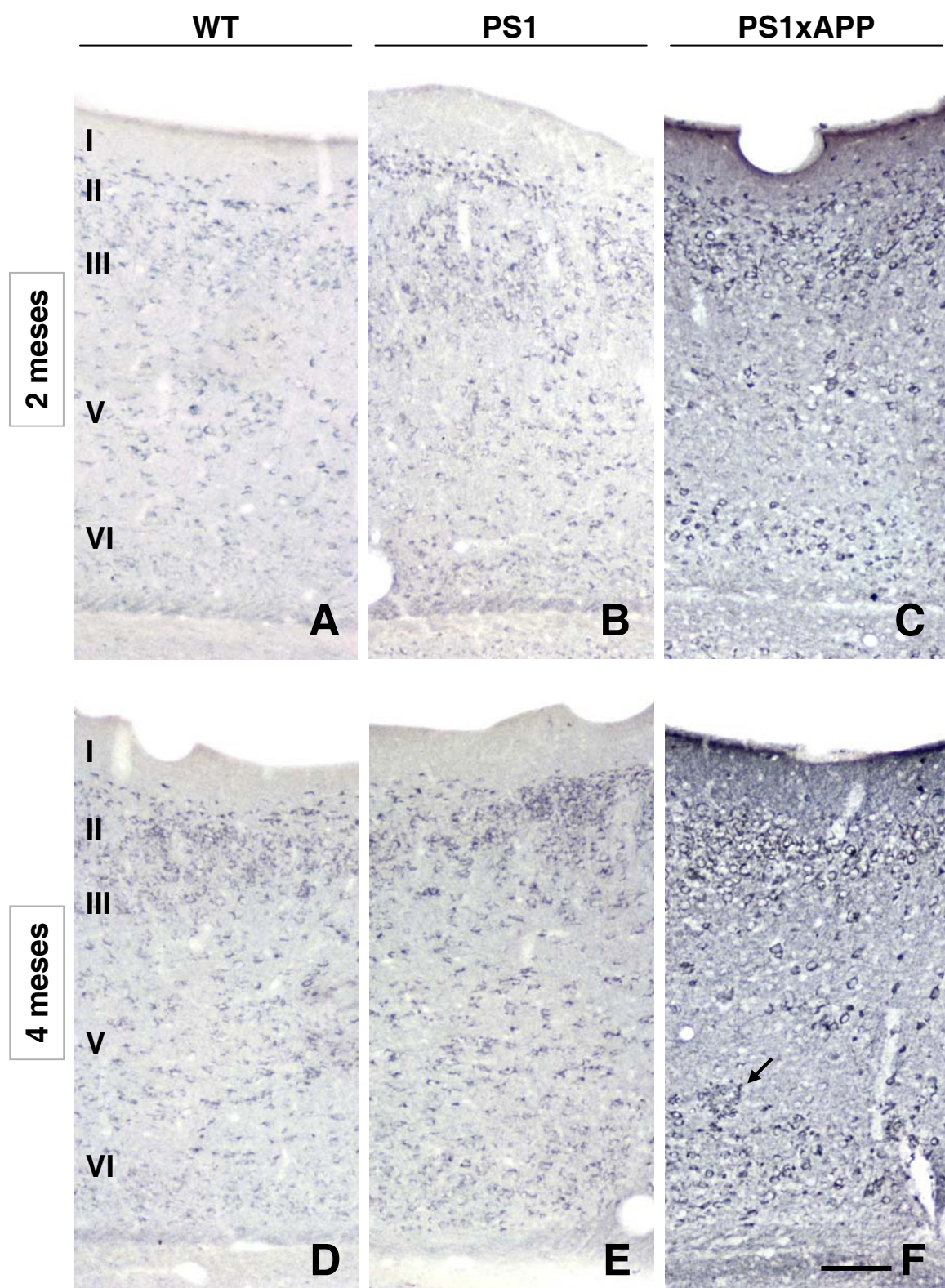


Figura 3.35. Inmunohistoquímica para hAPP-CTF en la corteza entorrinal de animales WT (A y D), PS1 (B y E) y PS1xAPP (C y F) de 2 (A-C) y 4 (D-F) meses de edad. El inmunomarcaje con el anticuerpo contra el fragmento C-terminal del APP humano muestra tinción en las neuronas principales en los animales control WT y PS1 a 2 y 4 meses de edad. El marcaje es más intenso en los animales PS1xAPP que en los controles. A los 4 meses, comienzan a observarse las primeras neuritas distróficas inmunopositivas alrededor de las placas amiloides (flecha). Barra de escala: 100 μm .

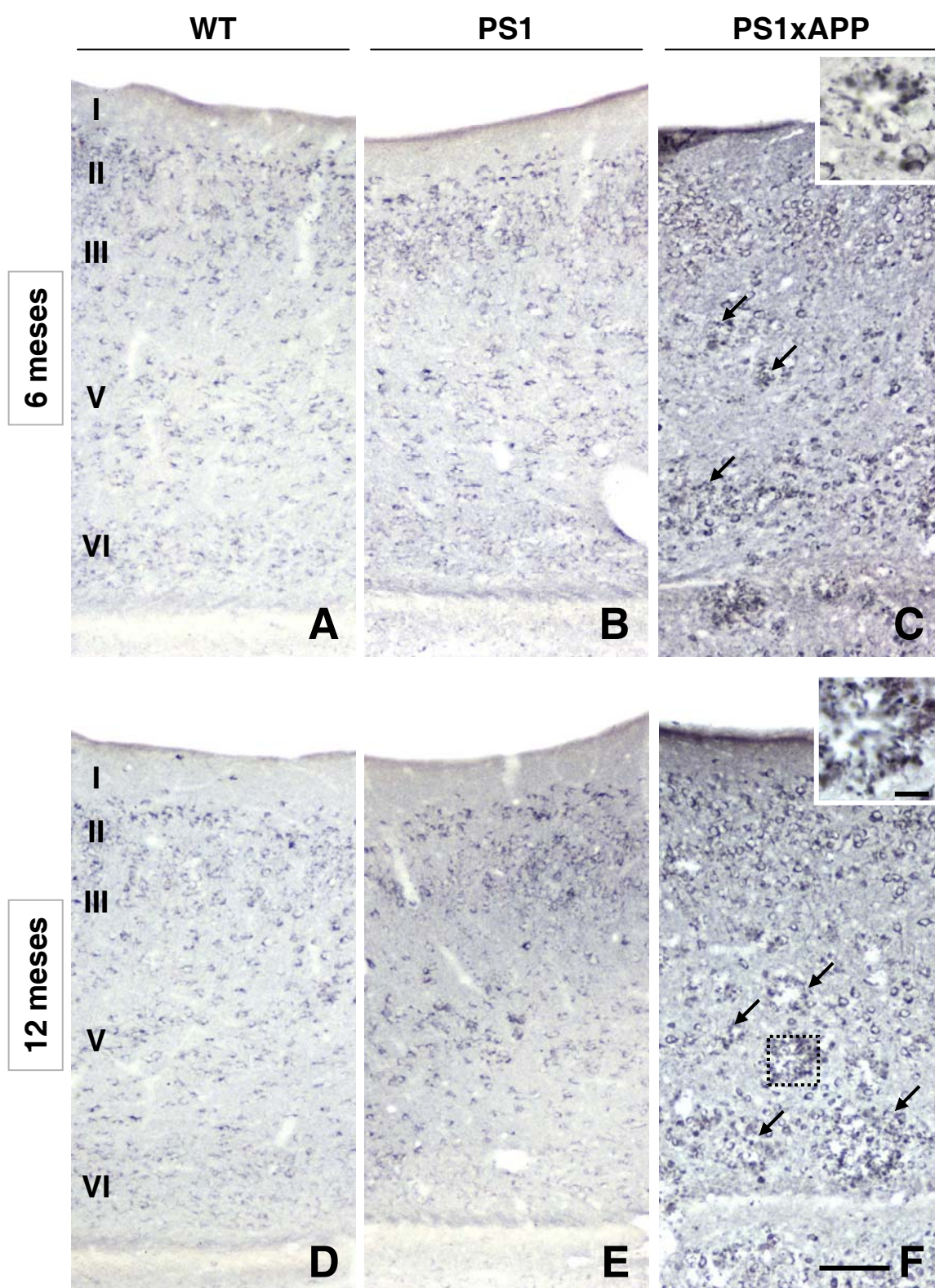


Figura 3.36. Inmunohistoquímica para hAPP-CTF en la corteza entorrinal de animales WT (A y D), PS1 (B y E) y PS1xAPP (C y F) de 6 (A-C) y 12 (D-F) meses de edad. A los 6 y 12 meses de edad, los animales control mantienen un leve inmunomarcaje de las neuronas principales con el anticuerpo hAPP, mientras que en los doble transgénicos se aprecia un marcaje mucho más intenso en los somas neuronales y en neuritas distróficas alrededor de las placas (flechas y ver insertos en C y F). Barras de escala: 100 μ m (A-F); insertos: 20 μ m.

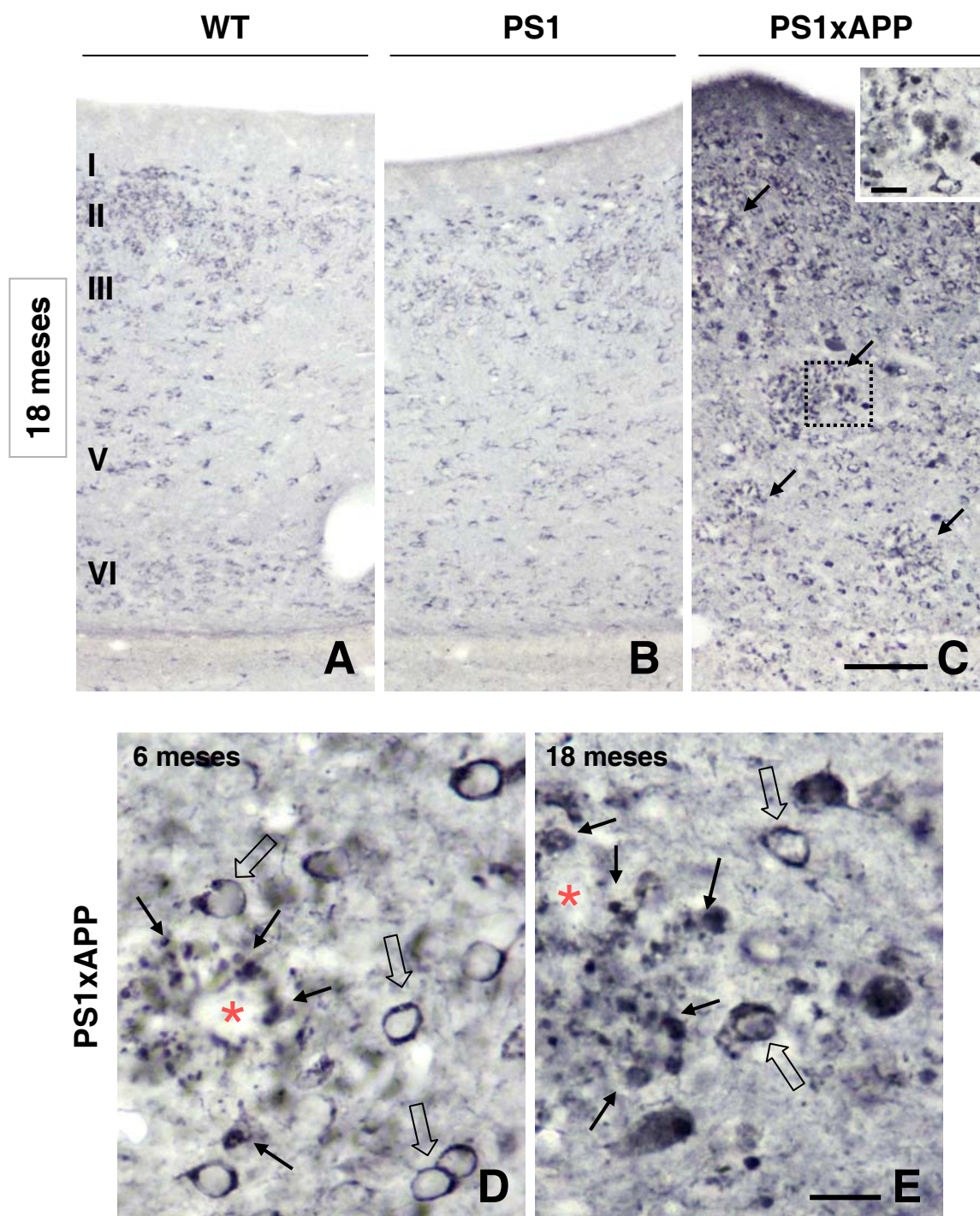


Figura 3.37. Inmunohistoquímica para hAPP-CTF en la corteza entorrinal de animales WT (A), PS1 (B) y PS1xAPP (C) de 18 meses de edad. A los 18 meses de edad, los controles WT y PS1 poseen el mismo patrón de inmunomarcaje, mientras que los animales PS1xAPP muestran un marcaje de mayor intensidad en los somas y neuropilo. Además, las placas están rodeadas por numerosas neuritas distróficas (flechas en C). En las imágenes de detalle (D y E) se muestran las neuronas principales (flechas abiertas) y las neuritas distróficas (flechas) marcadas con hAPP alrededor de placas de amiloide (asteriscos). Barras de escala: 100 μ m (A-F); 20 μ m (D y E).

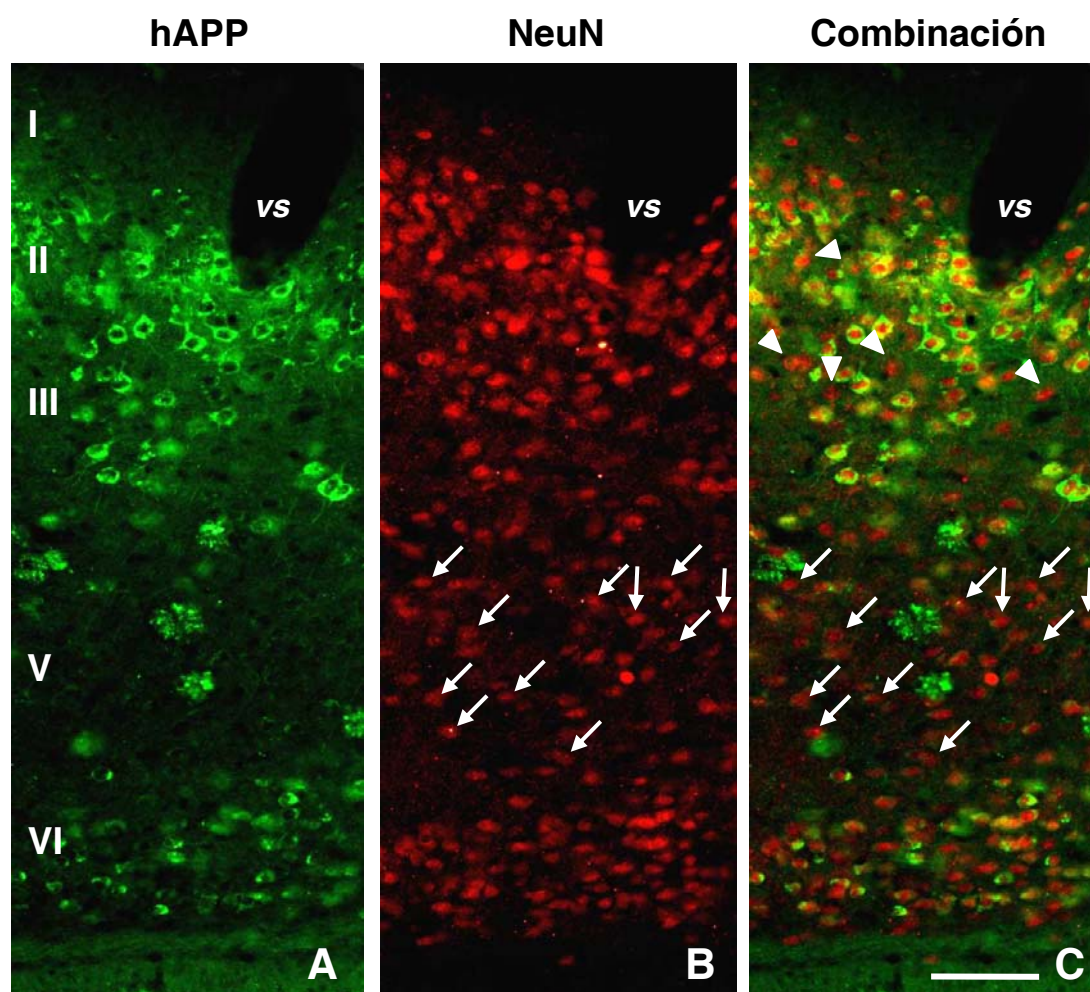


Figura 3.38. Expresión laminar de hAPP-CTF. Inmunofluorescencia doble para hAPP (verde) y NeuN (rojo) en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 4 meses de edad. A lo largo de la columna cortical, la expresión de hAPP (A) está restringida a las neuronas principales de capa II, III y VI, mientras que la mayoría de las neuronas de capa V (flechas) son inmunonegativas para este anticuerpo. El marcador nuclear NeuN (B) permite distinguir los núcleos neuronales en toda la columna cortical. La imagen combinada (C) revela que la mayoría de neuronas de capas II, III y VI son inmunopositivas para hAPP y sólo algunas son inmunonegativas (cabezas de flecha; interneuronas). Sin embargo, la capa V, en general, no presenta inmunotinción somática para anti-hAPP. Microscopía de epifluorescencia. vs: vaso sanguíneo. Barra de escala: 100 μ m.

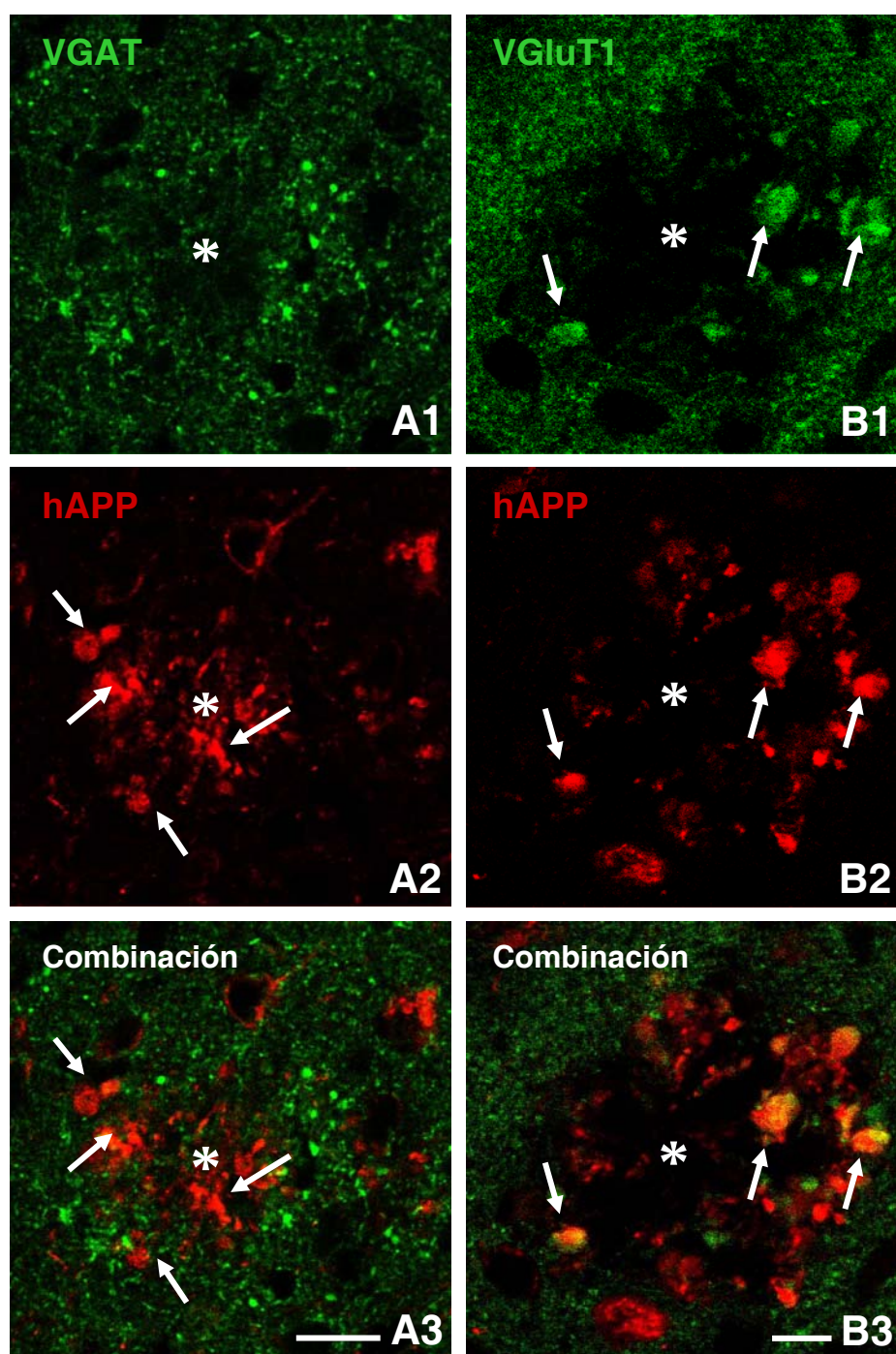


Figure 3.39. Expresión de hAPP-CTF en las neuritas distróficas. Inmunofluorescencia doble para VGAT/hAPP (A) y VGLUT1/hAPP (B) en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 6 meses de edad. VGAT y VGLUT1 aparecen en verde y hAPP en rojo. En las imágenes de microscopía confocal puede observarse que las neuritas distróficas hAPP-positivas (A2 y A3, flechas) no se corresponden con axones GABAérgicos, marcados con VGAT (A1). Sin embargo, las neuritas distróficas de neuronas principales glutamatérgicas, marcadas con VGLUT1 (B1), co-expresan la proteína precursora amiloide hAPP (B3, flechas). El asterisco indica la placa amiloide. Barras de escala: 25 μ m.

se muestra en la Fig. 3.41. Como se puede observar en las imágenes de microscopía, a los 2 meses de edad no se apreció inmunomarcaje, mientras que, a los 4 meses, aparecieron las primeras placas inmunoteñidas, que eran de pequeño tamaño y poco numerosas, localizadas principalmente en las capas profundas de la corteza entorrinal. A los 6 meses, las placas aumentaron en número y tamaño, y se localizaban a lo largo de toda la columna cortical, sin presentar una preferencia específica. A los 12 meses, el patrón de depósito de las placas extracelulares fue muy similar. Existían placas desde la capa I hasta la VI y su tamaño siguió aumentando, al igual que su número. A los 18 meses de edad, el número de depósitos de pequeño tamaño pareció disminuir para dominar aquellos de gran diámetro, aunque la presencia se mantuvo en toda la corteza entorrinal.

Respecto al análisis con el anticuerpo contra $A\beta_{42}$ (Fig. 3.42), el patrón de expresión temporal mostró muchas similitudes con el marcador anterior. Sin embargo, el número de placas inmunorreactivas sí fue mayor, aparentemente. No se observó marcaje a los 2 meses de edad en ninguna de las capas de la corteza entorrinal y no fue hasta los 4 meses cuando aparecieron los primeros depósitos inmunomarcados. Los de mayor tamaño se localizaban en las capas profundas de la corteza, pero también se observaron pequeños depósitos de menor tamaño en las capas superficiales. A los 6 meses de edad, el depósito extracelular se hizo más homogéneo, existiendo placas de diferentes diámetros a lo largo de toda la columna cortical y en todas las capas. A los 12 meses, parece que las placas se hacían más compactas, no eran tan difusas como a los 6 meses y su forma era más redondeada. A los 18 meses de edad, el patrón de expresión se mantuvo de forma similar a lo que ocurría en edades anteriores, con placas que no alcanzaban un tamaño muy grande a lo largo de la corteza entorrinal.

Seguidamente, se estudió el patrón de expresión temporal de los depósitos de amiloide empleando un anticuerpo que reconoce específicamente las formas de $A\beta$ oligomérico. El anticuerpo **M71/3** es capaz de reconocer pequeñas cantidades de amiloide oligomérico, es decir, la agregación de péptidos (monómeros) de entre 12 y 24 unidades. Este anticuerpo no reacciona con el $A\beta$ monomérico, fibrilar ni con formas no procesadas de APP, ya que es específico de la conformación. Este anticuerpo policlonal (Fig. 3.43) marcó una mayor cantidad de depósitos inmunoteñidos en la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP de la amplia batería de marcadores empleados contra las formas de $A\beta$ utilizados. A los 2 meses de edad, no se apreció inmunomarcaje. Por el contrario, a los 4 meses, se observaron placas extracelulares inmunorreactivas que eran de mayor tamaño en las capas profundas que en las superficiales. A los 6 meses, la tinción se extendió por toda la corteza entorrinal, incluso en capa I, donde no se suele detectar placas a estas edades. Aparecían placas de tamaño considerable, aunque fue más notable la gran cantidad de depósitos pequeños que aparecían por toda la corteza. A los 12 y 18 meses de edad, prácticamente toda la totalidad de la corteza entorrinal era positiva para este anticuerpo contra las formas oligoméricas, apareciendo marcadas las placas y el neuropilo. Sin embargo, no se detectaron cuerpos celulares inmunorreactivos a ninguna de las edades analizadas.

Posteriormente, se pasó a analizar las formas fibrilares del $A\beta$, empleando dos tinciones histológicas con colorantes que se unen específicamente a estas conformaciones.

La Tioflavina S es una fluoresceína que se une exclusivamente a moléculas con estructura en hoja β plegada. Se piensa que el rojo congo posee una afinidad similar por el mismo tipo de estructuras, aunque se desconoce exactamente a qué se une el colorante. No obstante, los dos reconocen la forma fibrilar del A β (oligómeros agregados entre sí).

El marcaje de placas con **Tioflavina S** (Fig. 3.44) se observó por primera vez a los 4 meses de edad, principalmente en las capas profundas de la corteza entorrinal. Aparecieron algunos depósitos pequeños en las capas superficiales, pero muy minoritarios. A los 6 meses, aumentó el número y tamaño de las placas marcadas con el colorante, pero con el mismo patrón de expresión, es decir, con mayor número y tamaño en las capas profundas de la corteza que en las superficiales. A edades más avanzadas, como son los 12 y 18 meses de edad, aumentó considerablemente el número y tamaño de los depósitos fibrilares. La abundancia de placas en las capas superficiales fue siempre menor que en las capas profundas.

Para el **rojo congo** (Fig. 3.45) el patrón de expresión fue similar al anterior. De igual modo, no se observó marcaje a la edad de 2 meses, mientras que a los 4 comenzaron a aparecer los primeros depósitos congofílicos. Sin embargo, éstos eran menos numerosos y de menor tamaño que los marcados para la Tioflavina S a la misma edad. A los 6 meses de edad apareció un mayor número de placas congofílicas, menos en las capas superficiales y más en las profundas, donde eran de mayor diámetro. A los 12 meses de edad, los depósitos eran más abundantes. Sin embargo, a los 18 meses, el número de placas congofílicas no parecía incrementar, aun aunque su diámetro sí aumentaba con la edad, siendo más compactas que a edades anteriores.

Posteriormente, se realizó un estudio comparativo del patrón de formación de placas con los seis marcadores empleados para las diversas formas de A β en animales de 6 meses de edad, momento en el que tiene lugar el proceso neurodegenerativo temprano en este modelo (Fig. 3.46). Como se puede observar en las microfotografías, el marcaje extracelular para 6E10, A β_{40} y A β_{42} fue muy similar, apareciendo las placas preferentemente en las capas profundas y siendo éstas de mayor diámetro que las que aparecían en capas superficiales. En cambio, la marca obtenida con el anticuerpo oligomérico M71/3 fue mucho más abundante a lo largo de toda la corteza entorrinal. Para los marcadores fibrilares, Tioflavina S y rojo congo, el número de depósitos marcados fue mucho menor, prácticamente restringidas a las capas profundas, apareciendo las placas menos difusas.

3.2.3. Las capas profundas de la corteza entorrinal presentan la mayor carga amiloide, con un aumento del tamaño y el número de placas con la edad

Para conocer si efectivamente la formación de las placas tenía lugar preferentemente en las capas profundas de la corteza entorrinal, se realizó un estudio cuantitativo comparativo de la carga de A β entre las capas superficiales (I-III) y profundas (IV-VI) en animales PS1xAPP desde los 2 a los 18 meses de edad (Fig. 3.47 A). Este estudio se realizó mediante análisis de imagen por densitometría y se expresó en tanto por ciento del área entorrinal ocupada por las placas amiloides marcadas con Tioflavina S. A los 2 meses

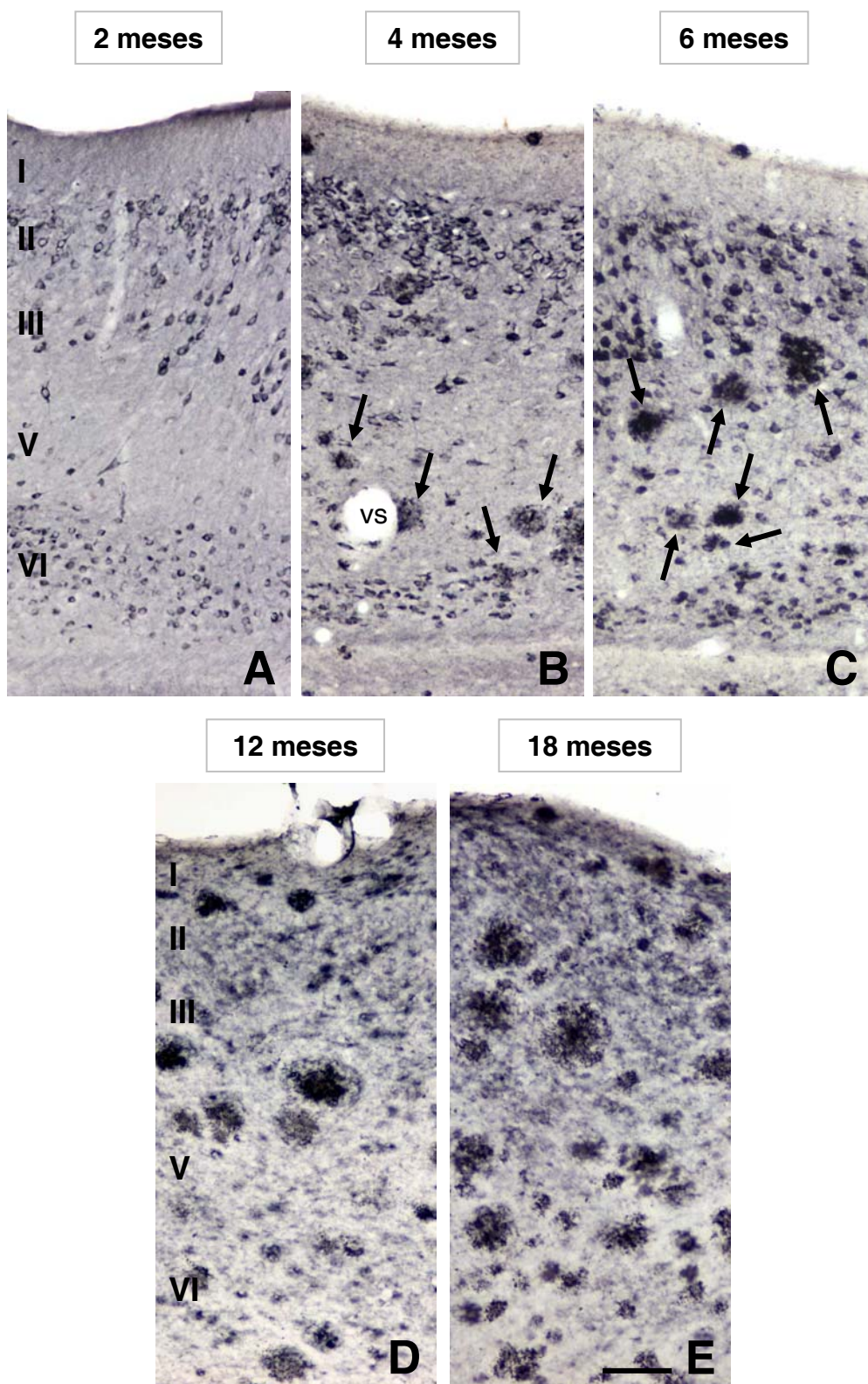


Figura 3.40. Patrón de expresión temporal de Aβ extracelular en la corteza entorrinal. Inmunohistoquímica para 6E10 en animales PS1xAPP de 2 (A), 4 (B), 6 (C), 12 (D) y 18 (E) meses de edad. Los depósitos extracelulares comienzan a observarse en animales de 4 meses de edad. El número y tamaño de las placas aumentan gradualmente con la edad. A edades tempranas (4 y 6 meses), los depósitos (flechas) se acumulan preferentemente en capas profundas, pero con el avance de la edad (12 y 18 meses) aparecen por todas las capas corticales. Los animales de 2 meses no muestran placas amiloides. vs, vaso sanguíneo. Barra de escala: 100 μm.

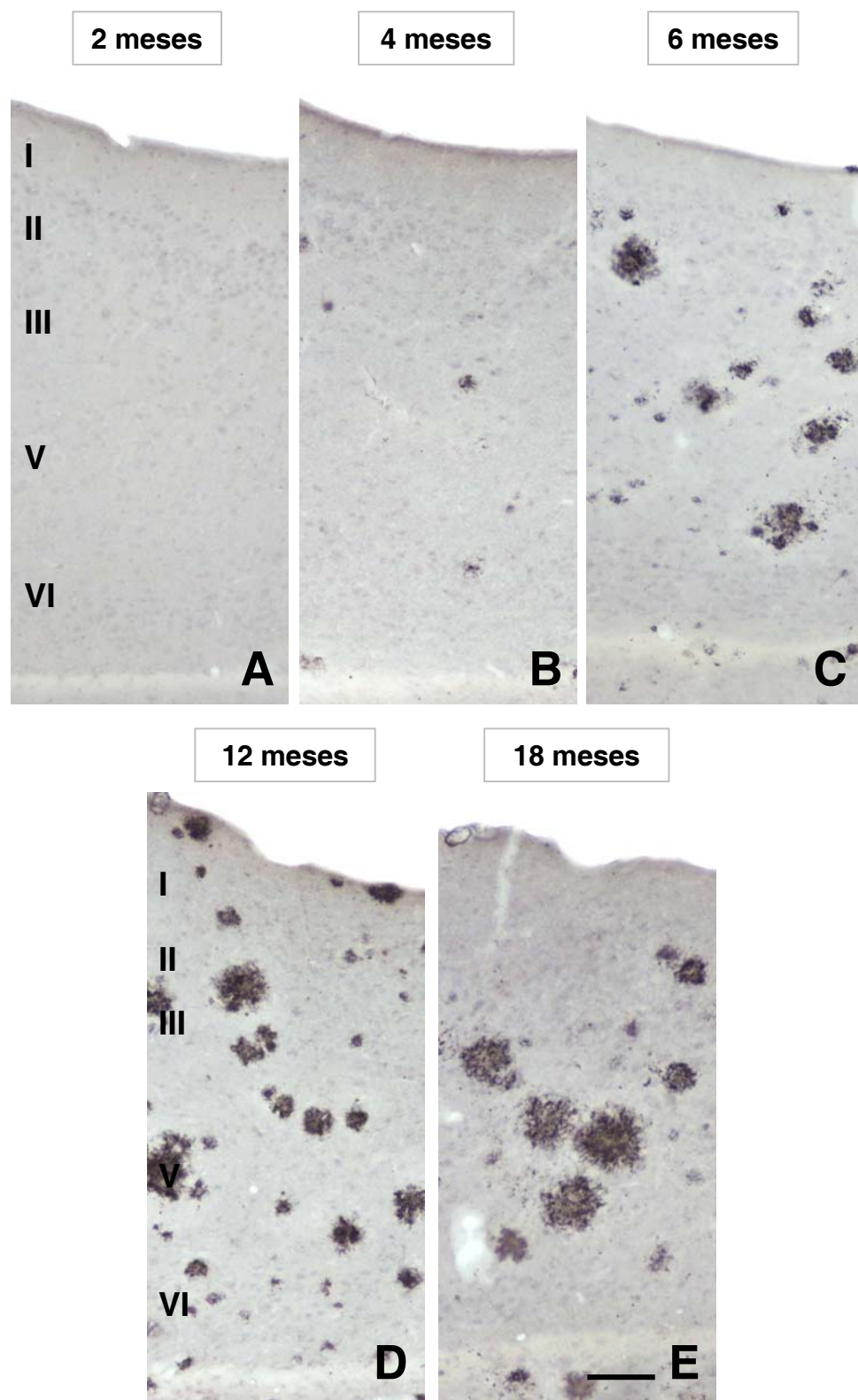


Figura 3.41. Patrón temporal de expresión de $A\beta_{1-40}$ en la corteza entorrinal. Inmunohistoquímica con anti- $A\beta_{1-40}$ en animales PS1xAPP de 2 (A), 4 (B), 6 (C), 12 (D) y 18 (E) meses de edad. El marcaje con este anticuerpo es exclusivamente extracelular. A los 2 meses no se observan aún depósitos inmunorreactivos. La aparición de placas inmunopositivas para este anticuerpo comienza a los 4 meses, siendo bastante notable su número a los 6 meses. Tanto el número como el tamaño de las placas aumentan progresivamente con el envejecimiento del animal. Barra de escala: 100 μ m.

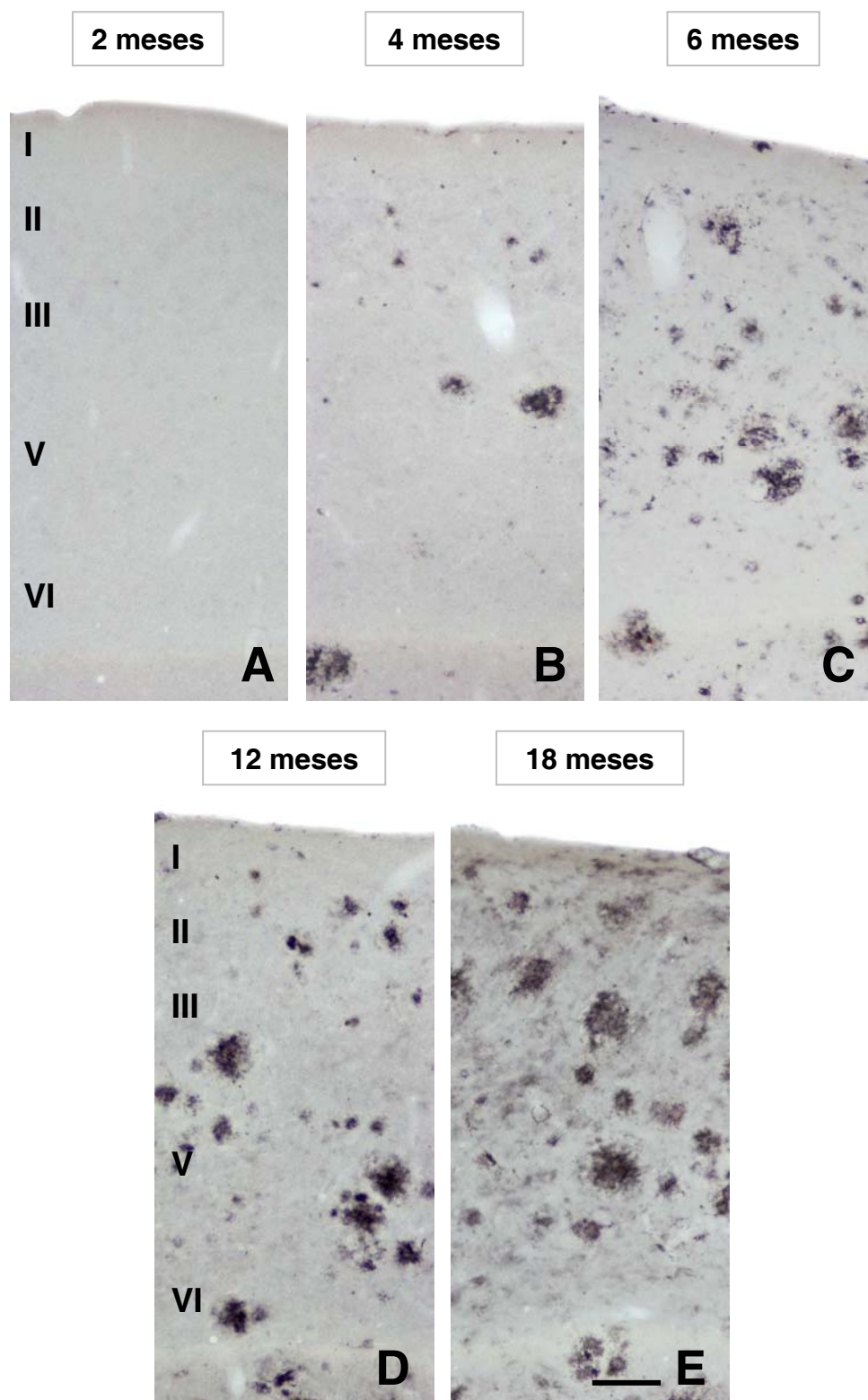


Figura 3.42. Patrón temporal de expresión de $A\beta_{1-42}$ en la corteza entorrinal. Inmunohistoquímica con anti- $A\beta_{1-42}$ en animales PS1xAPP de 2 (A), 4 (B), 6 (C), 12 (D) y 18 (E) meses de edad. El marcaje con este anticuerpo en la corteza entorrinal es extracelular. A los 2 meses no se observan aún depósitos inmunorreactivos. La aparición de placas inmunopositivas comienza a los 4 meses, aumentando considerablemente su número a los 6 meses de edad. Las placas de mayor tamaño se observan en las capas profundas. A los 12 y 18 meses de edad aumenta el número y tamaño de los depósitos y se localizan por toda la columna cortical. La tinción de neuropilo aumenta a los 18 meses. Barra de escala: 100 μ m.

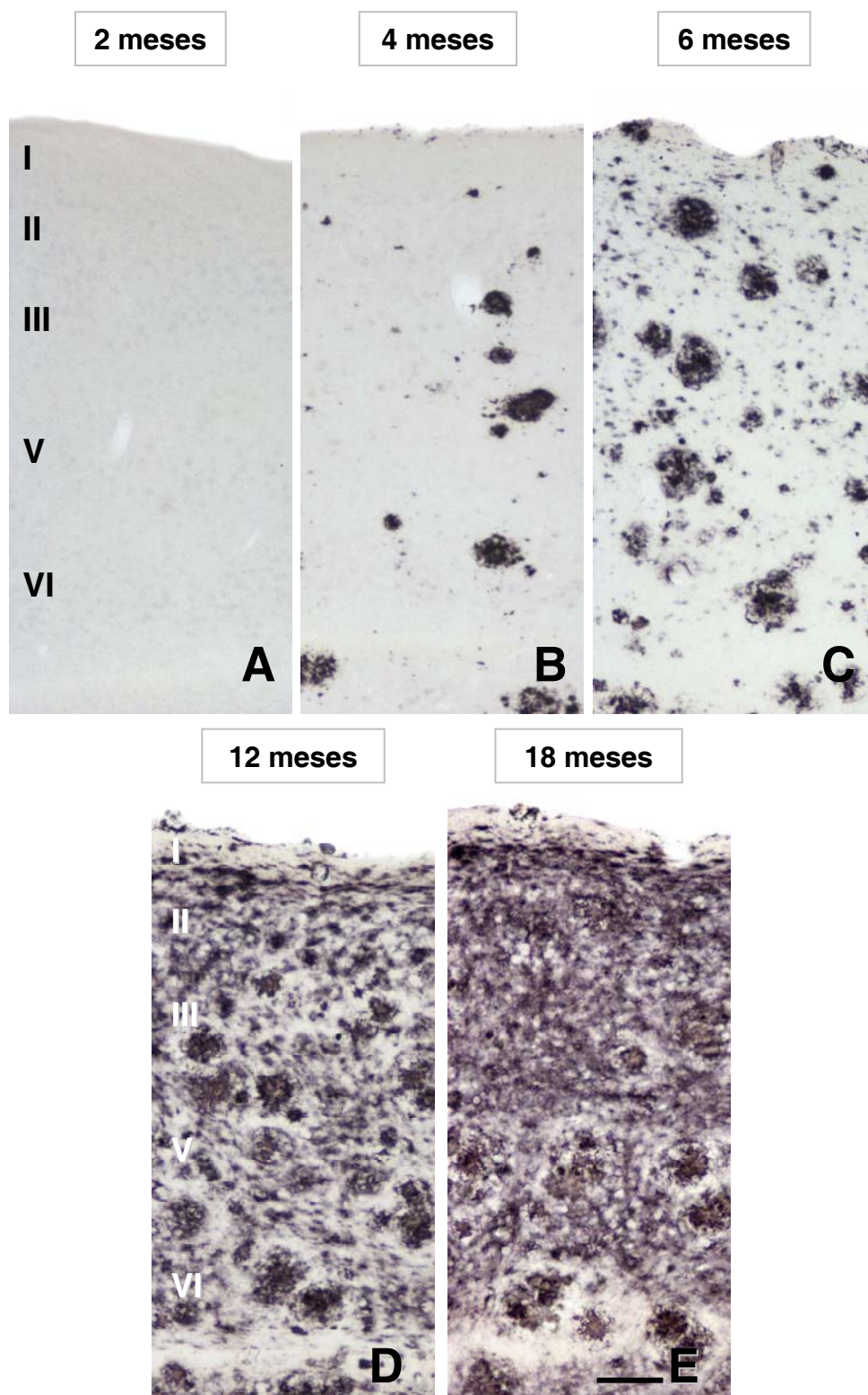


Figura 3.43. Patrón de expresión temporal de A β oligomérico en la corteza entorrinal. Inmunohistoquímica con el anticuerpo M71/3 en animales PS1xAPP de 2 (A), 4 (B), 6 (C), 12 (D) y 18 (E) meses de edad. A los 2 meses (A), no se detecta marcaje con este anticuerpo. Sin embargo, a los 4 meses la inmunotinción es muy notable y se localiza en placas a lo largo de toda la columna cortical, siendo más numerosas y grandes en capas profundas. A los 6 meses, el inmunomarcaje se extiende por todas las capas, aumentado considerablemente el número de placas. A edades avanzadas, además de numerosas placas, existe una intensa tinción de neuropilo de aspecto fibrilar. Barra de escala: 100 μ m.

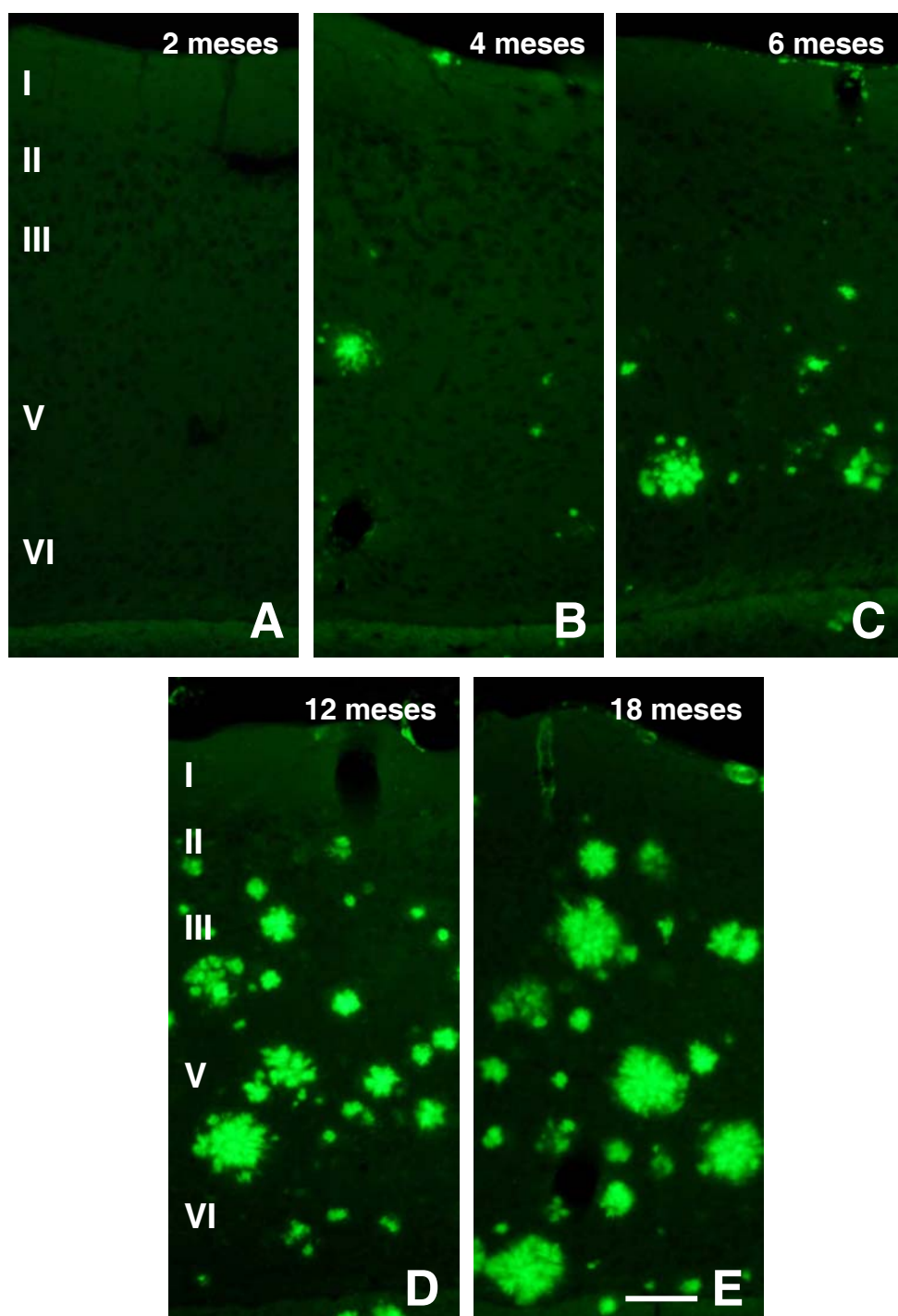


Figura 3.44. Patrón temporal de deposición de A β fibrilar en la corteza entorrinal. Tinción fluorescente de placas con Tioflavina S en animales PS1xAPP de 2 (A), 4 (B), 6 (C), 12 (D) y 18 (E) meses de edad. A los 2 meses no existe marcaje con Tioflavina S, que comienza a ser visible a partir de los 4 meses de edad en las capas profundas de la corteza. A los 6 meses, la presencia de placas fibrilares, preferentemente en capas profundas, es bastante notable. El número de placas y su diámetro aumenta espectacularmente con la edad, como se puede observar a los 12 y 18 meses. A ninguna de las edades analizadas se observa marcaje intracelular. Microscopía de epifluorescencia. Barra de escala: 100 μ m.

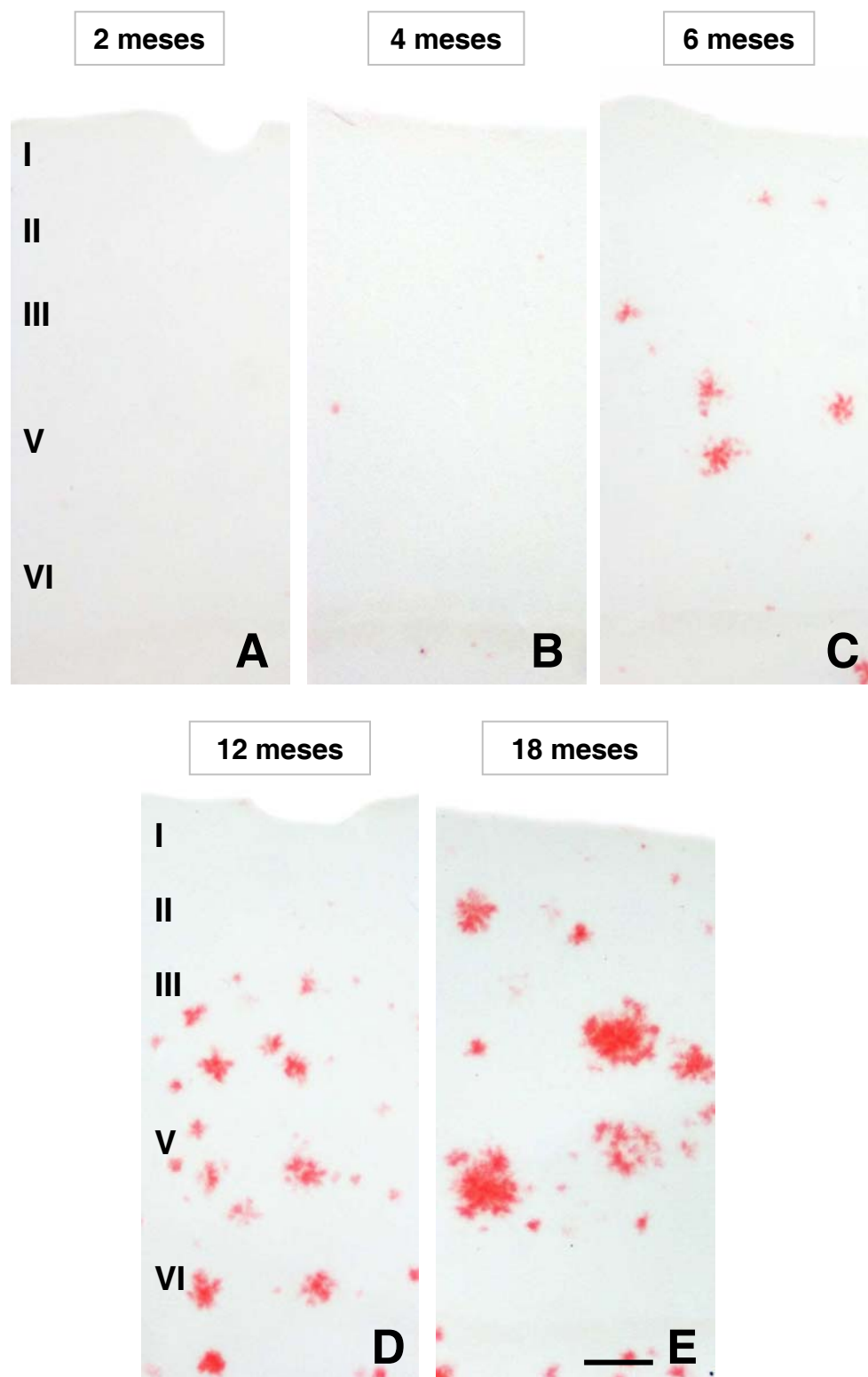


Figura 3.45. Patrón temporal de deposición de A β fibrilar en la corteza entorrinal. Tinción con rojo congo en secciones de animales PS1xAPP de 2 (A), 4 (B), 6(C), 12 (D) y 18 (E) meses de edad. El marcaje con rojo congo no es visible a los 2 meses y muy escaso a los 4 meses de edad. A los 6 meses, ya se detectan placas congofílicas, preferentemente localizadas en las capas profundas. La aparición de placas fibrilares aumenta gradualmente con la edad, tanto en número como en tamaño de las placas. A los 18 meses, se observan las placas de mayor tamaño. Barra de escala: 100 μ m.

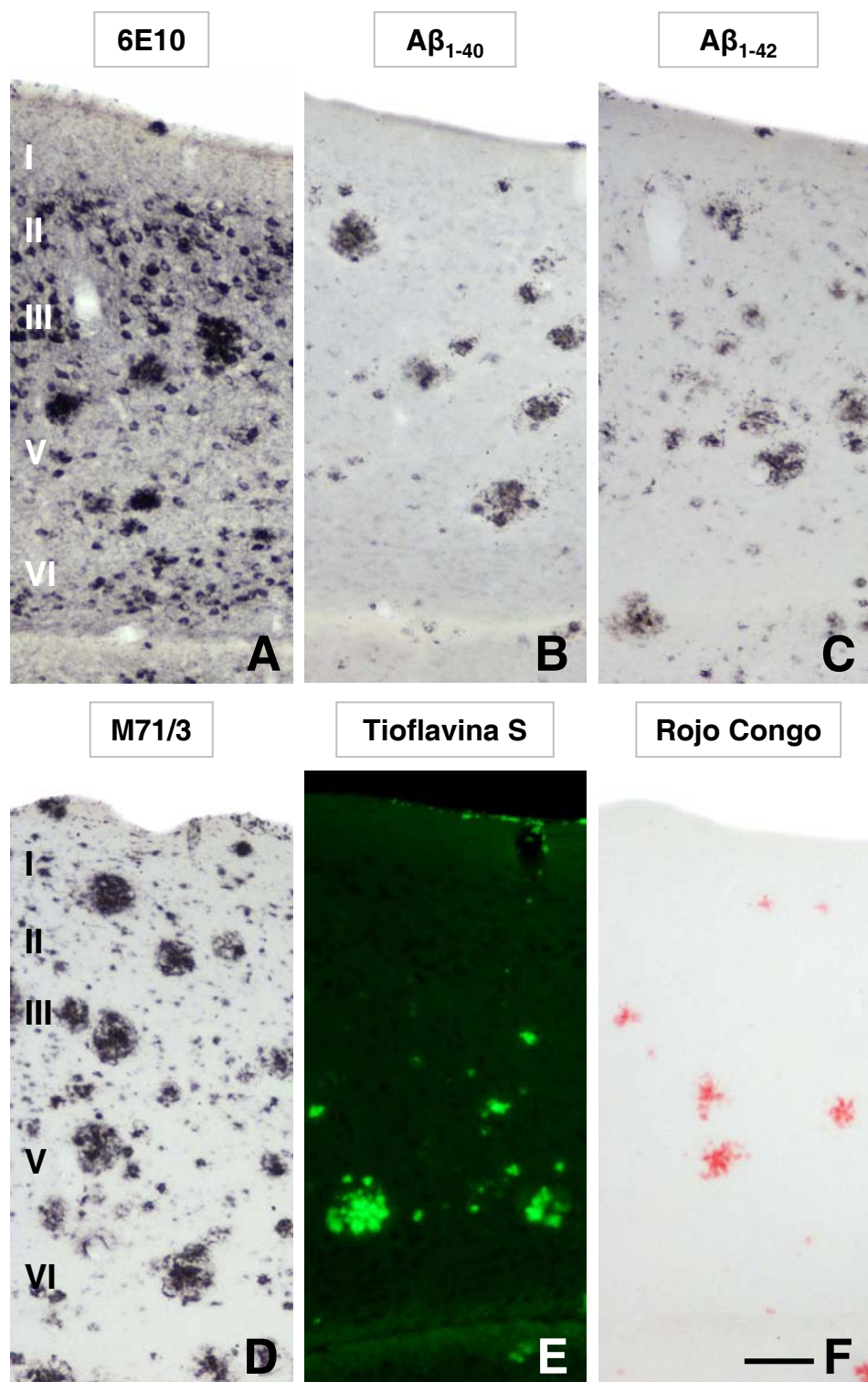


Figura 3.46. Estudio comparativo de la expresión de diversas formas de A β en la corteza entorrinal de animales transgénicos PS1xAPP a los 6 meses de edad. Excepto con 6E10 (marca A β total, pero también formas precursoras), los demás marcadores sólo tiñen depósitos extracelulares. Con todos los marcadores, las placas son muy patentes a los 6 meses de edad, sobre todo en las capas profundas de la corteza entorrinal. A β ₁₋₄₂ y, en especial, las formas oligoméricas (M71/3), son muy abundantes en las placas. Las formas fibrilares (Tioflavina S y Rojo congo) no son muy abundantes a esta edad. Barra de escala: 100 μ m.

de edad, como hemos visto para todos los marcadores empleados, no se detectó marca alguna de depósitos extracelulares con las técnicas empleadas. A los 4 meses de edad, la carga amiloide en la corteza entorrinal fue del $0,17 \pm 0,15\%$ en las capas superficiales y del $0,59 \pm 0,24\%$ en las capas profundas, lo que supone que las capas profundas poseían 3,4 veces más carga amiloide que las capas superficiales a la misma edad (T de Student, $p < 0,001$). A los 6 meses de edad, el depósito de A β incrementó rápidamente, alcanzando una carga del $0,89 \pm 0,65\%$ y $3,85 \pm 1,14\%$ en las capas superficiales y en capas profundas, respectivamente, lo que indica que la carga amiloide en las capas profundas era 4,3 veces superior a la carga de las capas superficiales (T de Student, $p < 0,001$). A los 12 meses, la carga de A β era de $2,18 \pm 1,59\%$ en las capas superficiales y de $7,06 \pm 2,11\%$ en las capas profundas (3,2 veces más en las capas profundas que en las superficiales; T de Student, $p < 0,05$). Finalmente, a los 18 meses de edad, se seguía manteniendo este patrón de depósito extracelular. Las capas superficiales presentaron una carga amiloide de $6,06 \pm 2,44\%$ y las capas profundas una carga de $11,26 \pm 2,56\%$, lo que suponía que las capas profundas de la corteza entorrinal presentaban 1,9 veces más carga amiloide que las capas profundas (T de Student, $p < 0,05$).

Además, realizamos una curva de incremento temporal de la carga amiloide (Fig. 3.47 B) para analizar la pendiente (m) que existía con la edad. Se puede observar que el aumento de la carga amiloide no ocurría de forma homogénea con la edad, sino que existía un mayor formación de depósitos de A β entre los 4 y los 6 meses de edad, sobre todo en las capas profundas ($m=1,39$) en comparación con las superficiales ($m=0,31$). Es precisamente en este intervalo de edad cuando tiene lugar el proceso neurodegenerativo selectivo de neuronas piramidales en capas profundas. A partir de esta edad, la deposición de A β se producía de forma más lenta en las capas profundas, mientras que en las superficiales el mayor incremento en la carga amiloide se producía entre los 12 y los 18 meses de edad. Por lo tanto, la carga amiloide es significativamente mayor en capas profundas que en superficiales y aumenta de forma muy acelerada entre los 4 y 6 meses de edad (es 6,5 veces superior a 6 meses que a 4; T de Student, $p < 0,001$), mientras que es más gradual a partir de esa edad.

Este aumento de carga amiloide con la edad puede estar relacionado con un aumento del número de placas, del diámetro de las placas o de ambos. Para dilucidar este punto, hemos analizado el número de placas por mm^2 desde los 4 a los 18 meses de edad en las capas profundas de la corteza entorrinal, clasificándolas en cuatro rangos de tamaño: placas de menos de $200 \mu\text{m}^2$, entre 200 y $500 \mu\text{m}^2$, entre $500-2000 \mu\text{m}^2$ y placas mayores de $2000 \mu\text{m}^2$. Este estudio (Fig. 3.48) reveló que en las capas profundas existía un incremento significativo del número de placas por unidad de área con la edad en todos los rangos estudiados. Como era de esperar, observamos un incremento significativo en el número de placas/ mm^2 total a los 6 meses de edad, siendo 2,5 veces superior que a los 4 meses de edad ($67,41 \pm 21,32$ a los 4 meses frente a $172,75 \pm 53,80$ a los 6 meses; 4 secciones/animal, $n=3-5$, Tukey $p < 0,05$). Además, el número de placas $< 2000 \mu\text{m}^2$ disminuyó a los 6 meses en comparación con los 4 meses. En el resto de rangos analizados, a los 6 meses las placas $< 200 \mu\text{m}^2$ aumentaron 1,8 veces; las placas de 200-

500 μm^2 se incrementaron 2,3 veces y las placas de 500-2000 μm^2 11,3 veces (4 secciones/animal, $n=3-5$, Tukey $p<0,05$) en comparación con el 4 meses de edad.

A continuación, analizamos la evolución temporal del porcentaje de placas en función del tamaño (placas de menos de 200 μm^2 , entre 200 y 500 μm^2 , entre 500-2000 μm^2 y placas mayores de 2000 μm^2) desde los 4 a los 18 meses de edad (Fig. 3.49 A). En las capas profundas de la corteza entorrinal, el porcentaje de las placas de menor tamaño disminuía de forma significativa (Tukey $p<0,001$; 4 secciones/animal, $n=3-5$) de 4 a 12 meses de edad (del 71% al 28%), a la vez que aumentaba el porcentaje de las placas de tamaño superior a las 500 μm^2 desde los 6 meses de edad (del 6% a 4 meses al 58% a los 18 meses). El patrón con la edad fue similar y gradual, ya que a los 12 meses, las placas de menor tamaño no eran las mayoritarias, sino las de área mediana. A los 18 meses de edad, las placas con un área entre 500 y 2000 μm^2 suponían casi un 43% del total de placas depositadas y más del 15% las placas de área superior a los 2000 μm^2 . Es de destacar que a los 4 meses de edad en las capas IV-VI ya existían placas de tamaño grande, representando un 1,8% del total.

Esta distribución de las placas cuyo tamaño se veía incrementado a lo largo de las capas de la corteza entorrinal y con la edad del animal, se puede apreciar muy claramente en el histograma apilado de la Fig. 3.49 B. En él se observa que, en las profundas, el alto porcentaje de placas pequeñas a los 4 meses iba dejando paso con la edad, hasta los 18 meses, de forma gradual, a la aparición de placas de mayor tamaño. Es decir, las placas pequeñas, que a los 4 meses de edad suponían un 75% aproximadamente de la carga total de amiloide extracelular, pasan, a los 18 meses, a constituir alrededor del 25% del total de placas.

Resumiendo, el número de placas/área de tamaño superior a las 500 μm^2 aumentaba gradualmente con la edad, mientras que las de pequeño tamaño disminuían en número a lo largo del envejecimiento del animal.

3.2.4. Existe una gran variabilidad interindividual en la carga amiloide de la corteza entorrinal del modelo PS1xAPP a edades tempranas

En el hipocampo de este modelo existen diferencias interindividuales, a una misma edad, en cuanto a la producción y el procesamiento de la proteína APP y, por lo tanto, en la carga amiloide y el número de placas extracelulares (Caballero y col., 2007). Para analizar si la corteza entorrinal presentaba también esta variabilidad en la expresión de amiloide entre los diferentes individuos, que podría afectar al grado de neurodegeneración, se procedió a determinar el contenido en A β de 9 animales PS1xAPP de 6 meses de edad. Para ello, se utilizaron secciones inmunoteñidas con 6E10 (6 secciones/animal) y la posterior cuantificación mediante densitometría del porcentaje del área entorrinal ocupada por inmunorreactividad para este anticuerpo (Fig. 3.50 A). Los resultados mostraron que existía una gran diversidad en la carga amiloide entre los diferentes individuos, que variaba desde un 5% (el de menor carga amiloide) a un 70% (el de mayor carga) del total del área medida. De los 9 animales analizados, 3 poseían una carga menor al 10% (Fig. 3.50 B), otros 3 una

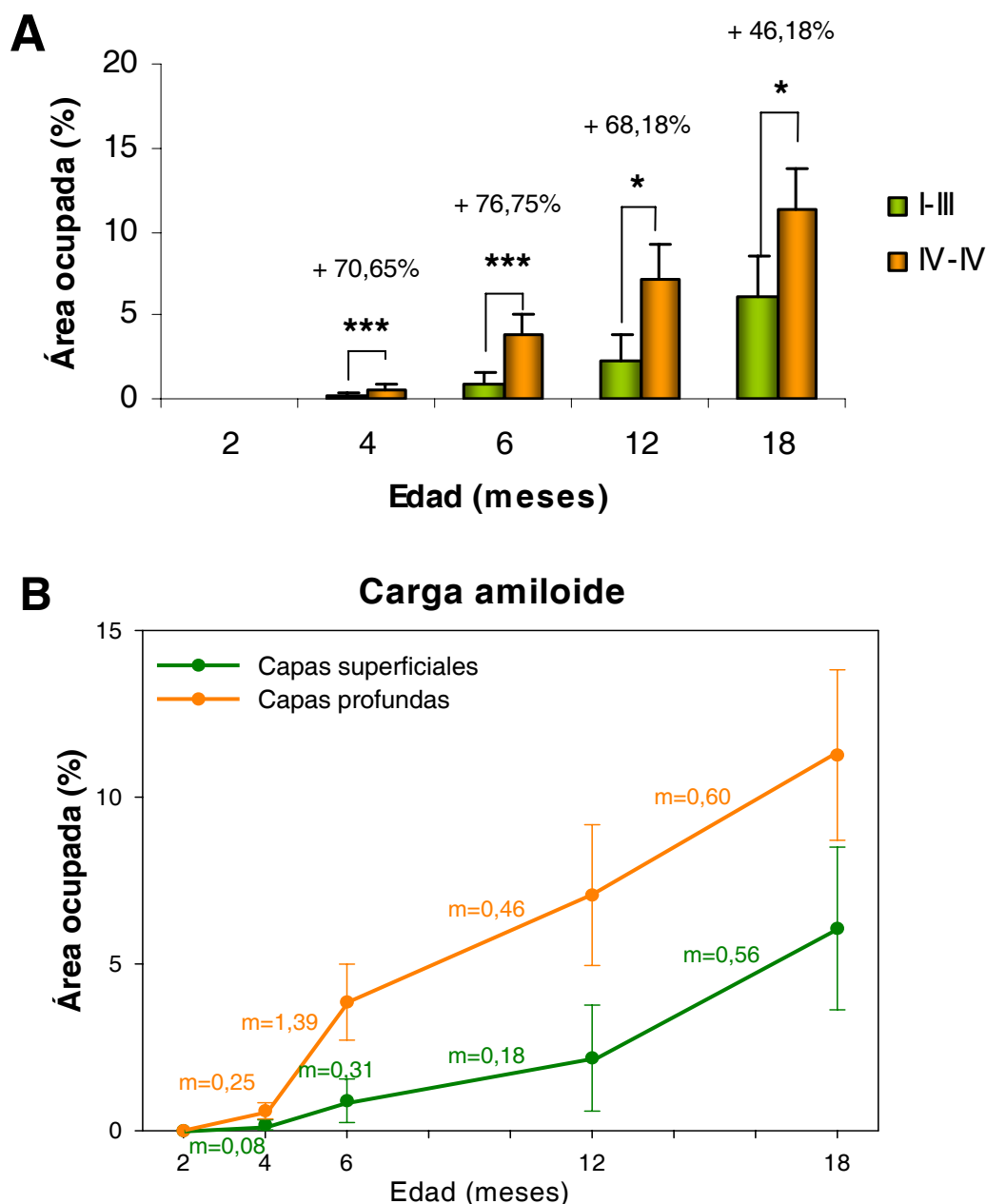


Figura 3.47. A) Porcentaje del área entorrinal ocupada por depósitos de A β en capas superficiales (I-III) y capas profundas (IV-VI) en animales PS1xAPP desde los 2 a los 18 meses de edad. Análisis de imagen de secciones teñidas con Tioflavina S. La acumulación extracelular de amiloide fibrilar comienza a los 4 meses y aumenta con la edad tanto en capas superficiales como profundas. La carga amiloide es significativamente mayor en capas profundas que en superficiales a todas las edades analizadas. En la gráfica se indican los porcentajes de aumento de la carga amiloide en capas profundas respecto a las superficiales. Esta diferencia laminar es muy notable a los 4 y 6 meses de edad (en capas profundas la carga amiloide es un 70% o más que en superficiales) y va disminuyendo a edades avanzadas, especialmente los 18 meses (la acumulación en capas profundas no supera el 50% de las superficiales). n=3/edad; 4 secciones/animal/edad; T de Student, *p<0,05; ***p<0,001. **B) Curva de incremento temporal de la carga amiloide en capas superficiales y profundas de la corteza entorrinal.** En esta gráfica se puede observar que el incremento en la carga amiloide no ocurre de forma homogénea con la edad. El aumento más notable en la formación de placas se da entre los 4 y 6 meses de edad y, a partir de esa edad, ocurre de una forma mas gradual. m: valor de la pendiente.

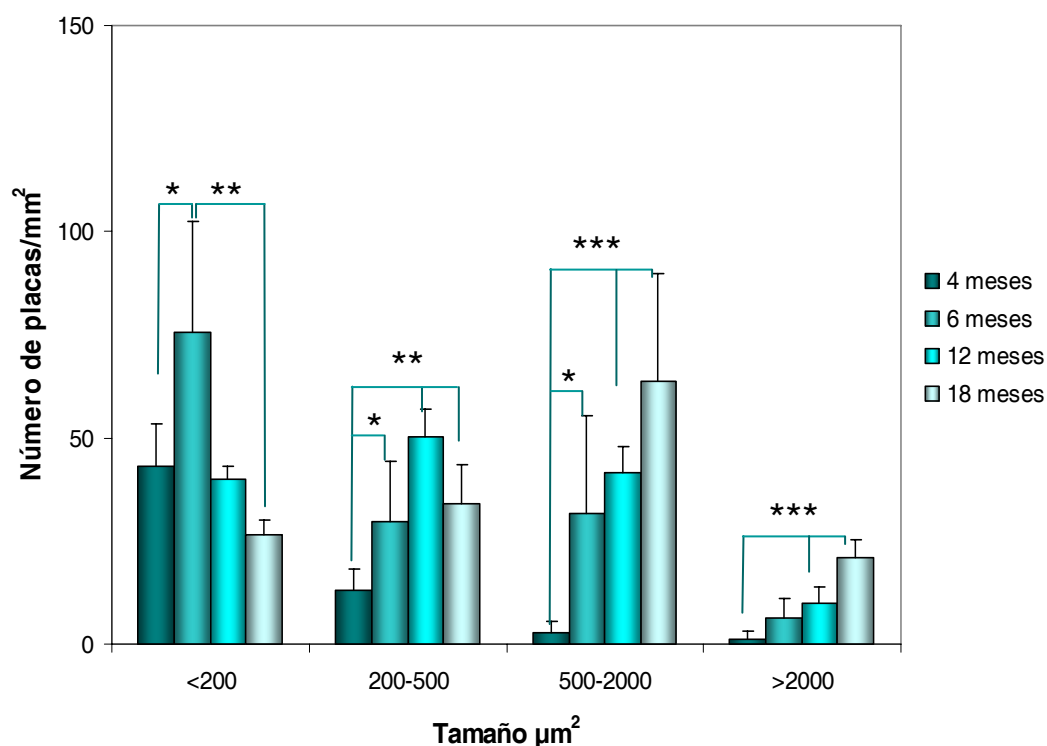


Figura 3.48. Estudio cuantitativo del número y el tamaño de las placas de A β en las capas profundas de la corteza entorrinal de animales PS1xAPP. Las placas han sido distribuidas en cuatro rangos de tamaño: <200 μm^2 , 200-500 μm^2 , 500-2000 μm^2 y >2000 μm^2 . En la gráfica se observa que existe un incremento en el número de placas por unidad de área con la edad. Además, mientras que a 4 y 6 meses predominan las placas de tamaño pequeño (<200 μm^2), a edades avanzadas (12 y 18 meses) predominan las placas mayores de 500 μm^2 . Entre los 4 y 6 meses de edad, cuando mueren las neuronas de capas profundas, además de aumentar el número de placas, el incremento es significativamente mayor para las placas de rango 500-2000 μm^2 . n=3-5; 4 secciones/animal; ADEVA de una vía, F(3, 12)=6,57, p=0,007 (<200 μm^2), F(3, 12)=8,81, p=0,002 (200-500 μm^2), F(3, 12)=8,10, p=0,003 (500-2000 μm^2), F(3, 12)=17,27, p<0,001 (>2000 μm^2), Tukey *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

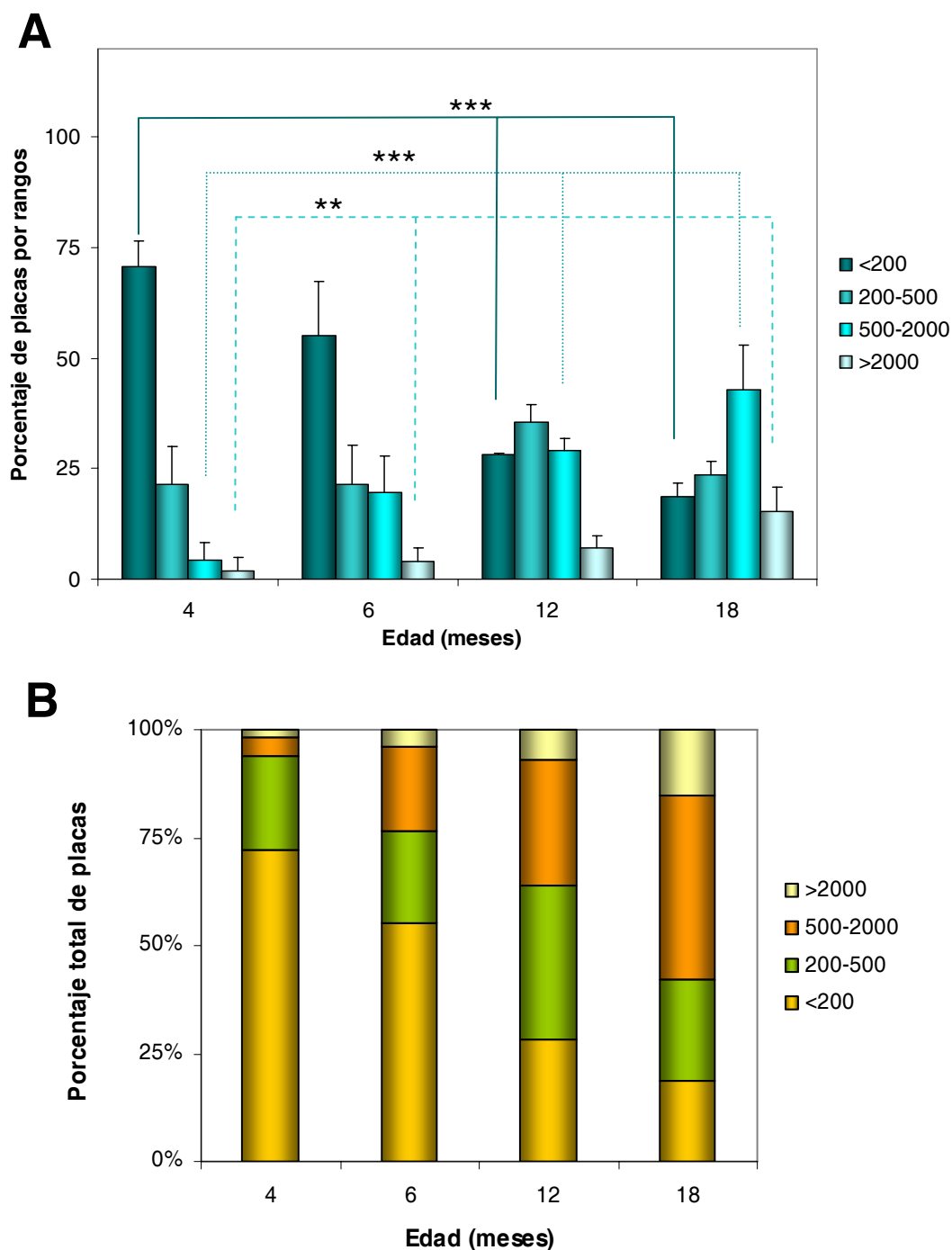


Figura 3.49. Evolución temporal del porcentaje de placas amiloides en función de su tamaño en las capas profundas de la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP desde los 4 a los 18 meses de edad. Los rangos de tamaño elegidos son: $<200 \mu\text{m}^2$, $200\text{-}500 \mu\text{m}^2$, $500\text{-}2000 \mu\text{m}^2$ y $>2000 \mu\text{m}^2$. El estudio revela cambios significativos con la edad, de tal forma que el porcentaje de placas de tamaño más pequeño es mayoritario a edades tempranas y, con la edad, aumenta el porcentaje de placas grandes a la vez que disminuye para las pequeñas. El 75% de las placas a los 4 meses presenta un tamaño inferior a los $200 \mu\text{m}^2$, porcentaje que disminuye progresivamente con la edad. La tendencia con la edad es el aumento del tamaño de las placas en los dos rangos mayores, siendo a los 18 meses mayoritarias aquellas que superan las $500 \mu\text{m}^2$. $n=3\text{-}5$; 4 secciones/animal. ADEVA de una vía, $F(15, 48)=37,69$, $p<0,001$; Tukey, $**p<0,01$; $***p<0,001$.

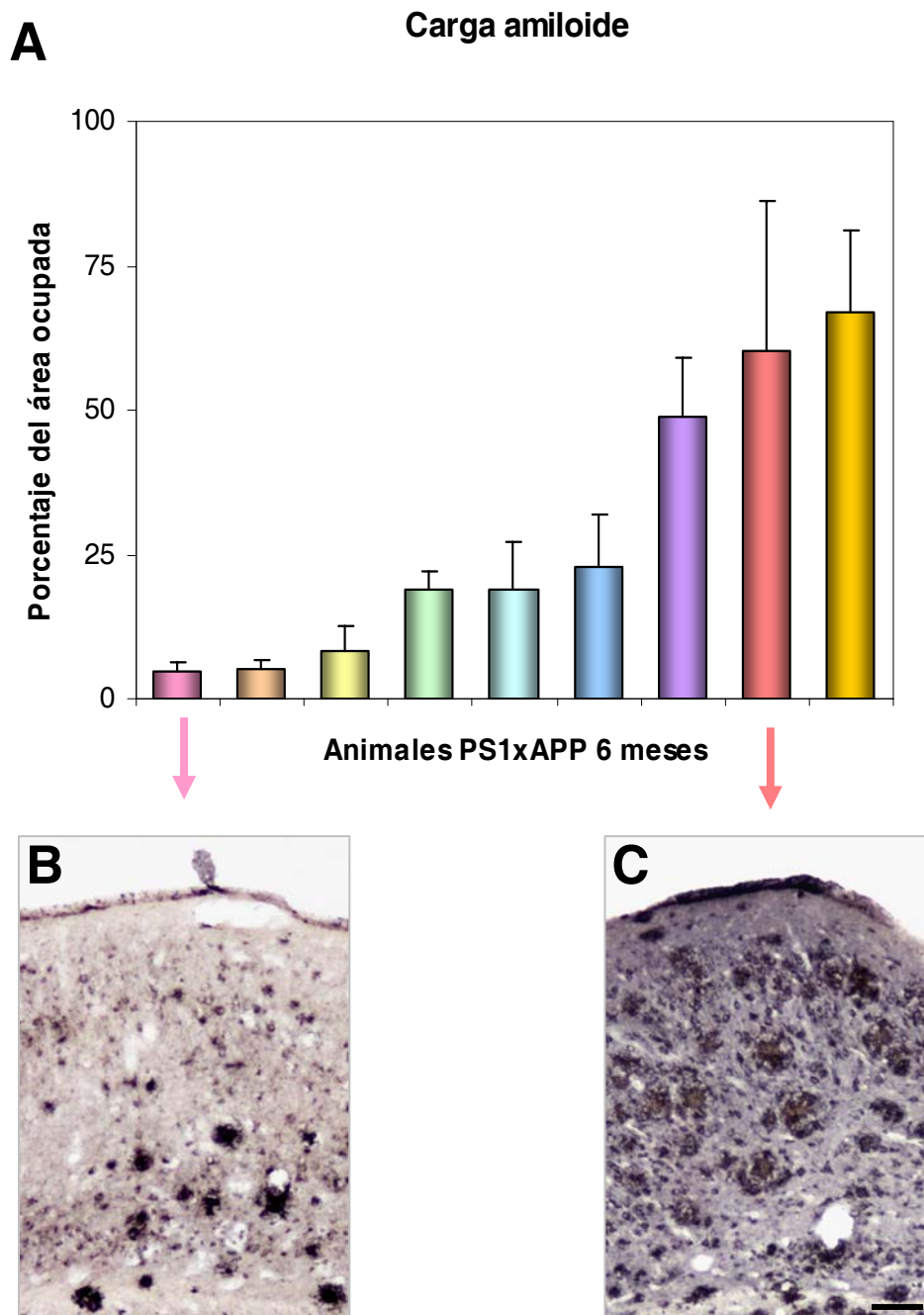


Figura 3.50. Variabilidad de la carga amiloide total (intra- y extracelular) en la corteza entorrinal entre distintos individuos PS1xAPP de 6 meses de edad. Debido a la variabilidad existente en la producción de A β de los animales transgénicos PS1xAPP, su expresión dentro de un mismo grupo de edad es heterogéneo. En la gráfica se representa la carga amiloide de 9 individuos distintos de 6 meses de edad. Para el marcaje de A β se ha utilizado el anticuerpo 6E10. El porcentaje del área entorrinal inmunoteñida con este anticuerpo varía desde menos de un 5% hasta casi un 70%. Las imágenes B y C son representativas de un animal con baja y otro con alta carga amiloide, respectivamente. Barra de escala: 100 μ m.

carga no superior al 25% del área de la corteza analizada y los otros 3 superaron el 50% del total (Fig. 3.50 C). Por lo tanto, la expresión de amiloide en la corteza entorrinal, al igual que el hipocampo, es muy variable entre individuos de una misma edad. Esta diferencia en la carga amiloide probablemente sea responsable de las variaciones en el grado de afectación patológica que muestra cada individuo, como el porcentaje de neurodegeneración y la presencia de neuritas distróficas entre otros y, por lo tanto, de las grandes desviaciones en los estudios cuantitativos.

3.2.5. β -amiloide intracelular en la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP. Las neuronas principales, excepto las de capa V, son inmunopositivas para 6E10 y NU4

De los anticuerpos empleados para marcar A β sólo dos de ellos mostraron un marcaje en somas neuronales: el anticuerpo 6E10 (para el amiloide total) y el anticuerpo NU4 (para las forma oligoméricas; Lambert y col., 2007). Por el contrario, el anticuerpo M71/3, aunque también es un anticuerpo específico contra formas oligoméricas, no mostraba marcaje intracelular en los experimentos realizados, como hemos visto anteriormente (Fig. 3.43), ya que, posiblemente, difiera de NU4 en el tipo de oligómeros que reconoce. En este sentido, datos preliminares (del laboratorio del Dr. Vitorica) indican que NU4 también parece reconocer otras moléculas oligoméricas, incluidos precursores como APP o C99 oligomerizados.

Se realizó un análisis comparativo del patrón de expresión intracelular con los anticuerpos 6E10 y NU4 en la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP a lo largo del envejecimiento (desde los 2 a los 18 meses de edad). Los animales control WT y PS1 no mostraron marca inmunopositiva con estos anticuerpos (no mostrado). En líneas generales, ambos anticuerpos mostraron patrones muy similares de inmunorreactividad. En la Fig. 3.51, se muestra el patrón de expresión a edades muy tempranas, 2 y 4 meses de edad. A los 2 meses de edad, cuando aún no se han desarrollado los primeros depósitos extracelulares de A β en los animales PS1xAPP, las neuronas principales de las capas II, III y VI presentaban una intensa inmunorreactividad, mientras que apenas aparecían células positivas en capa V para ambos marcadores. A los 4 meses, el marcaje intracelular de tipo citoplasmático se mantuvo en las mismas capas de la corteza entorrinal, mientras que comenzaban a aparecer las primeras placas extracelulares, también positivas para ambos anticuerpos. A los 6 meses (Fig. 3.52), el marcaje intracelular para estos anticuerpos, fue menos intenso, apareciendo tinción en el neuropilo. Con el anticuerpo NU4, el marcaje fue más extenso en toda la corteza entorrinal y, además, las placas no eran tan densas como las positivas para 6E10. A los 12 meses de edad, apenas se observaban neuronas con inmunotinción intracelular para estos anticuerpos. Ambos marcaban, principalmente, placas extracelulares, pero NU4 lo hacía de forma más profusa, con una amplia tinción de neuropilo y las placas seguían siendo más difusas que las marcadas con 6E10. Finalmente, a los 18 meses (Fig. 3.53), el patrón de expresión de ambos marcadores fue muy similar al observado a los 12 meses, aunque ya no se percibía ninguna neurona con marcaje intracelular. Por lo tanto, con ambos anticuerpos se observó marcaje somático en capas II,

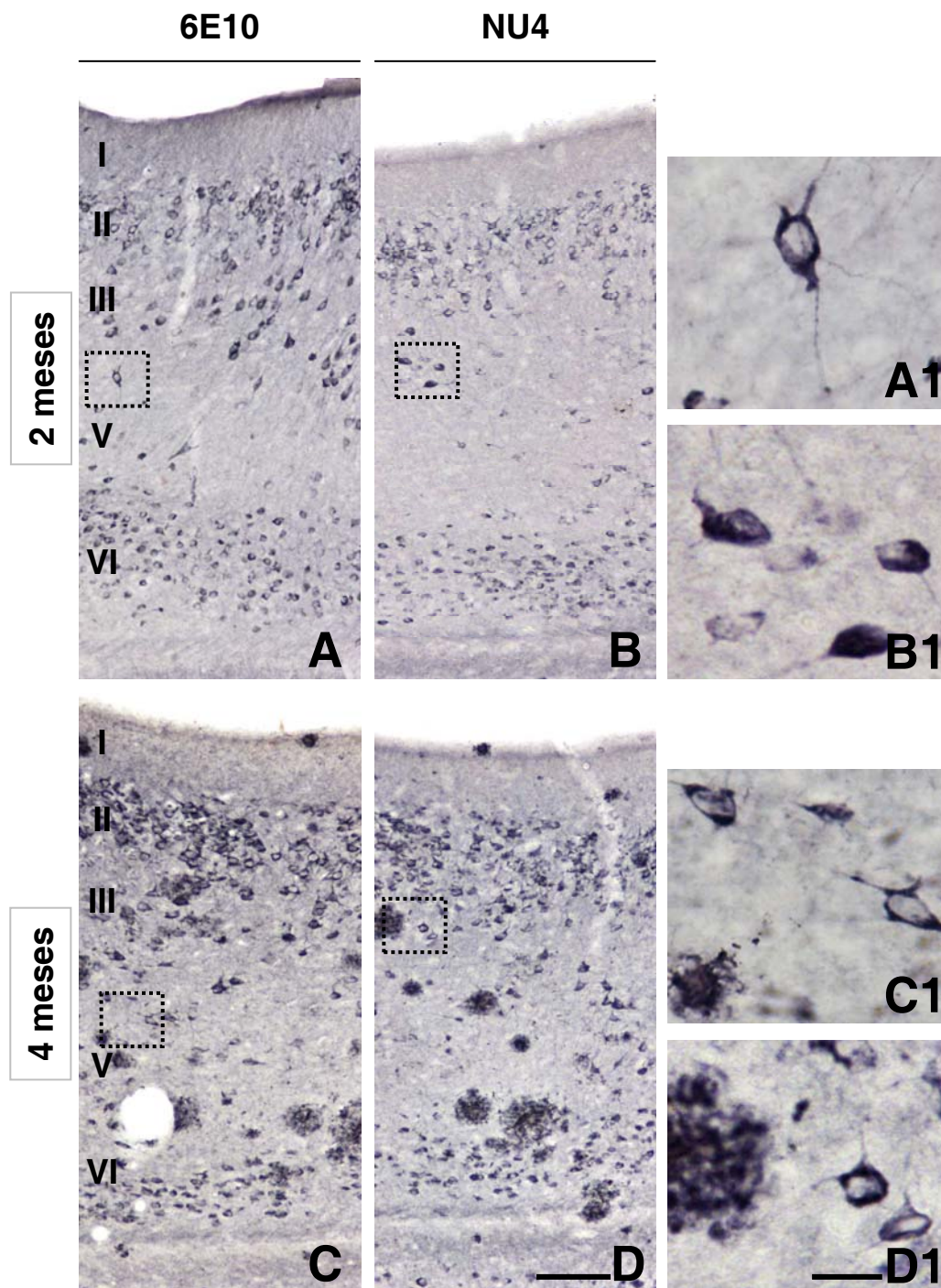


Figura 3.51. Expresión temporal de A β intracelular. Inmunohistoquímica con 6E10 (A, A1, C y C1) y NU4 (B, B1, D y D1) en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 2 (A y B) y 4 (C y D) meses de edad. El marcaje con los anticuerpos monoclonales 6E10 (amiloide total) y NU4 (amiloide oligomérico) es muy similar a ambas edades. A los 2 meses, se observa tinción intracelular en las neuronas de capas II-III y VI. Es de destacar que muy pocas neuronas en capa V aparecen inmunoteñidas. A los 4 meses, se observa la presencia de placas amiloides, principalmente en las capas profundas. En las imágenes a mayores aumentos se puede apreciar el intenso marcaje intracelular a nivel de somas con 6E10 (A1 y C1) y NU4 (B1 y D1). Barras de escala: 100 μ m (A-D); 20 μ m (A1-D1).

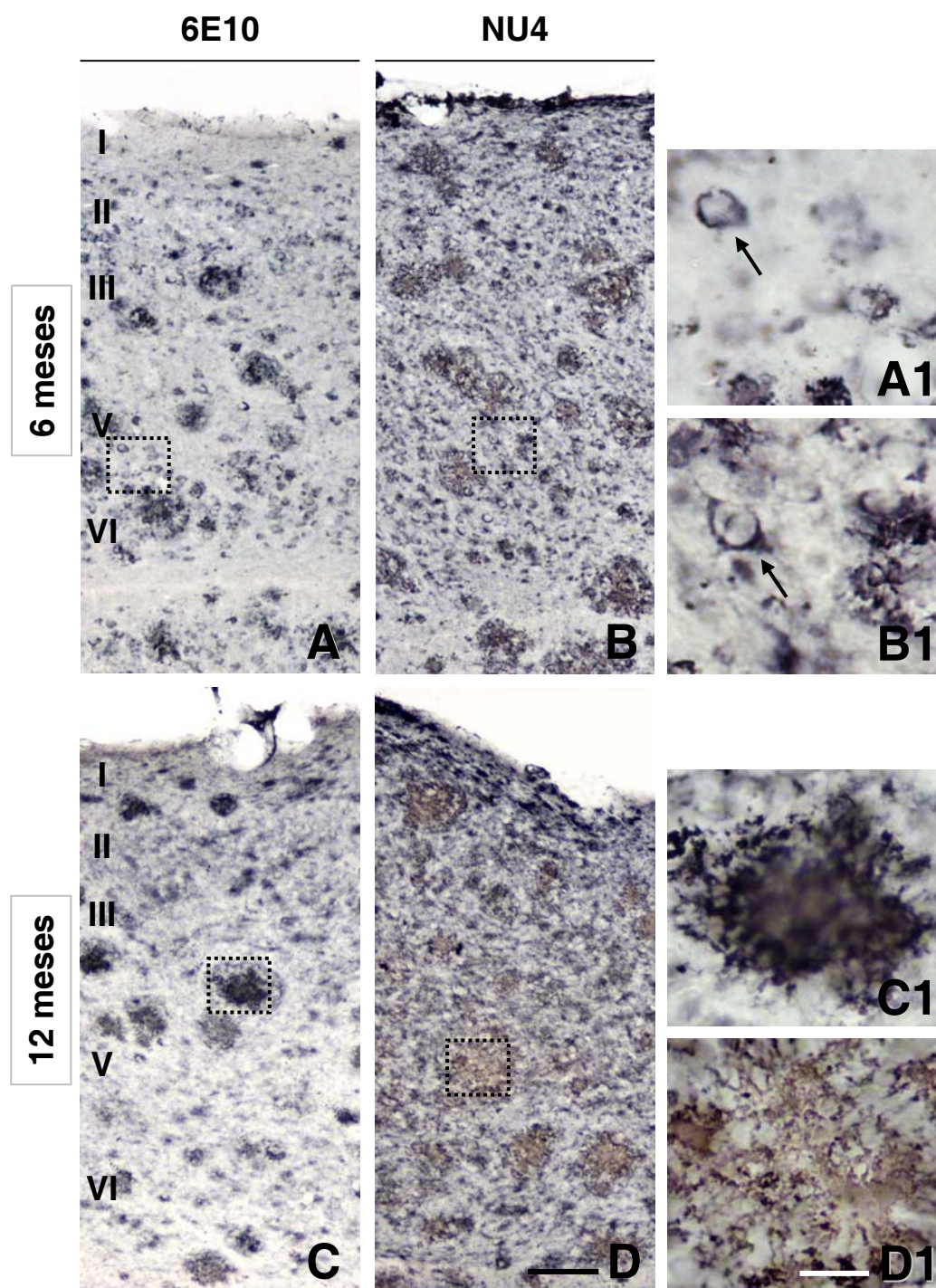


Figura 3.52. Expresión temporal de A β intracelular. Inmunohistoquímica con 6E10 (A, A1, C y C1) y NU4 (B, B1, D y D1) en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 6 (A y B) y 12 (C y D) meses de edad. A los 6 meses de edad, el marcaje intracelular es menos intenso que a edades más jóvenes y se observan numerosas placas a lo largo de la columna cortical. A los 12 meses, casi todo el marcaje se localiza en los depósitos extracelulares y una pequeña cantidad en el neuropilo fibrilar. Con el anticuerpo NU4, las placas tienen un aspecto más difuso y el neuropilo aparece más inmunoteñido que con 6E10. En las imágenes de detalle se muestra el marcaje somático intracelular a 6 meses (flechas en A1 y B1) y el marcaje de placas a 12 meses (C1 y D1). Barras de escala: 100 μ m (A-D); 20 μ m (A1-D1).

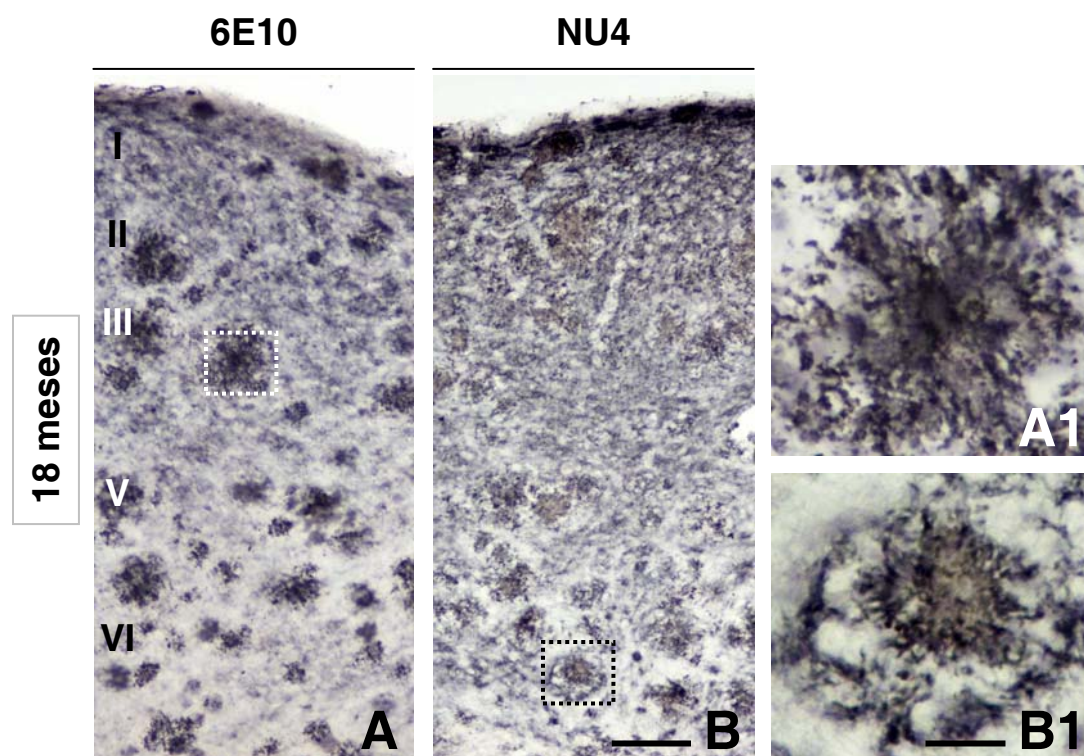


Figura 3.53. Expresión temporal de Aβ intracelular. Inmunohistoquímica con 6E10 (A) y NU4 (B) en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 18 meses de edad. A los 18 meses de edad, no se aprecia marcaje a nivel de somas. Sin embargo, existen numerosos depósitos de amiloide por toda la columna cortical y abundante neuropilo inmunoteñido. Las placas aparecen más intensamente teñidas con 6E10 que con NU4. En las imágenes de detalle se muestra una placa 6E10-positiva (A1) y otra NU4-positiva (B1). Barras de escala: 100 μm (A-D); 20 μm (A1-D1).

III y VI, cuya intensidad fue disminuyendo con la edad. No podemos descartar que este efecto pueda ser debido a un problema de secuestro del anticuerpo por parte de las placas, cuyo número y tamaño van aumentando con la edad, más que una disminución de la expresión a nivel somático con la edad. Es de destacar la ausencia de marcaje somático con estos anticuerpos en la capa V, al igual que ocurría con el anticuerpo para hAPP. Es precisamente en esta capa donde tiene lugar la muerte neuronal temprana en este modelo. Teniendo en cuenta el papel relevante que otros autores sugieren para el A β intracelular en la muerte neuronal, este resultado fue, en cierto modo, sorprendente.

3.2.6. Las neuronas principales de capa V de la corteza entorrinal, a diferencia de otras regiones corticales, no expresan hAPP y, por lo tanto, no son inmunorreactivas para anticuerpos contra β -amiloide

Teniendo en cuenta la ausencia de marcaje intracelular de la capa V de la corteza entorrinal para hAPP, 6E10 y NU4 en este modelo animal, nos planteamos ver si esto era específico de esta región cerebral o también ocurría en otras áreas corticales. Para ello, hemos realizado un análisis comparativo entre diversas regiones corticales a 2 y 6 meses de edad. En concreto, se han analizado la corteza auditiva y visual de la neocorteza y la corteza perirrinal y entorrinal de la paleocorteza.

A los 2 meses de edad (Fig. 3.54), la corteza visual y la corteza auditiva, presentaban una alta inmunorreactividad en los somas neuronales, principalmente en las capas profundas de la corteza (V y VI), donde se ubican las neuronas de proyección de estas zonas. Las demás capas apenas presentaban marcaje, exceptuando algunas neuronas de capas II de la corteza visual, existiendo una mayor tinción en el neuropilo de las capas V y VI. Por otro lado, la corteza perirrinal, área de transición entre la neocorteza y la corteza entorrinal (denominada en ocasiones perialocorteza), presentaba en el área 36 una tinción más similar a la neocorteza, con marcaje de las células principales de capa V y VI, mientras que la inmunorreactividad en el área 35 fue parecida a la de la corteza entorrinal, en donde se marcaban principalmente las neuronas de capa II, III y VI y muy pocas en capa V. Sin embargo, en la corteza entorrinal, el inmunomarcaje con 6E10 era mayoritario en las capas superficiales de la corteza (II y III) y en capa VI. Por lo tanto, a esta edad, donde no se detectan placas, era evidente que la capa V de la corteza entorrinal, junto con la del área 35 perirrinal, carecían o tenían muy pocas neuronas inmunorreactivas para 6E10. Sin embargo, las otras regiones corticales analizadas presentaban numerosas células en capa V con inmunotinción para este anticuerpo. En realidad, el patrón de marcaje era inverso en estas regiones, de tal forma que las regiones neocorticales y el área 36 perirrinal mostraban una tinción intraneuronal preferentemente en las capas (V y VI), mientras que la corteza entorrinal y 36 perirrinal mostraban tinción preferente en las capas superficiales (II y III), hecho que se correlaciona con las principales capas de proyección que posee cada región cortical.

A los 6 meses de edad (Fig. 3.55), puede observarse el mismo patrón de expresión laminar diferencial entre las regiones neocorticales, la corteza perirrinal y la entorrinal. A

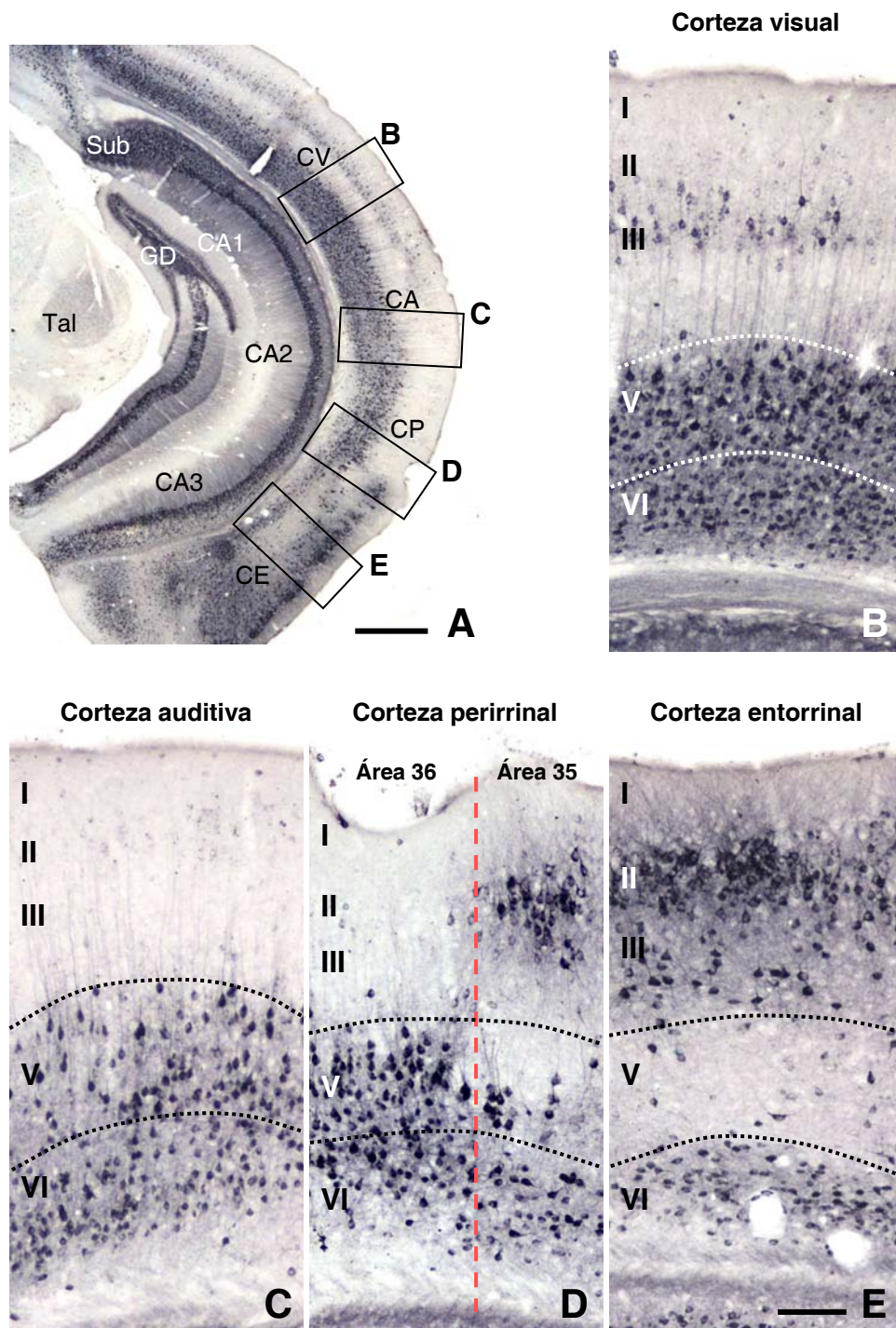


Figura 3.54. Patrón de inmunorreactividad laminar diferencial para 6E10 en diversas regiones corticales de animales PS1xAPP a los 2 meses de edad: corteza visual (B), auditiva (C), perirrinal (D) y entorrinal (E). Las diferentes regiones corticales poseen un patrón específico de expresión laminar (A). En regiones neocorticales (A y B), la inmunotinción es preferentemente en neuronas de capas profundas V y VI, mientras que, en paleocorteza (E), son las capas superficiales II-III, junto con capa VI, las más inmunoteñidas. La corteza perirrinal es una región de transición entre neocorteza (área 36) y paleocorteza (área 35). Es de destacar que la mayoría de las neuronas de capa V de la corteza entorrinal y el área 35 perirrinal no se marcan con 6E10. CA1, CA2, CA3: áreas del hipocampo propio; Sub: subículo; Tal: tálamo; CV: corteza visual; CA: corteza auditiva; CP: corteza perirrinal; CE: corteza entorrinal. Barras de escala: 500 μ m (A); 100 μ m (B-E).

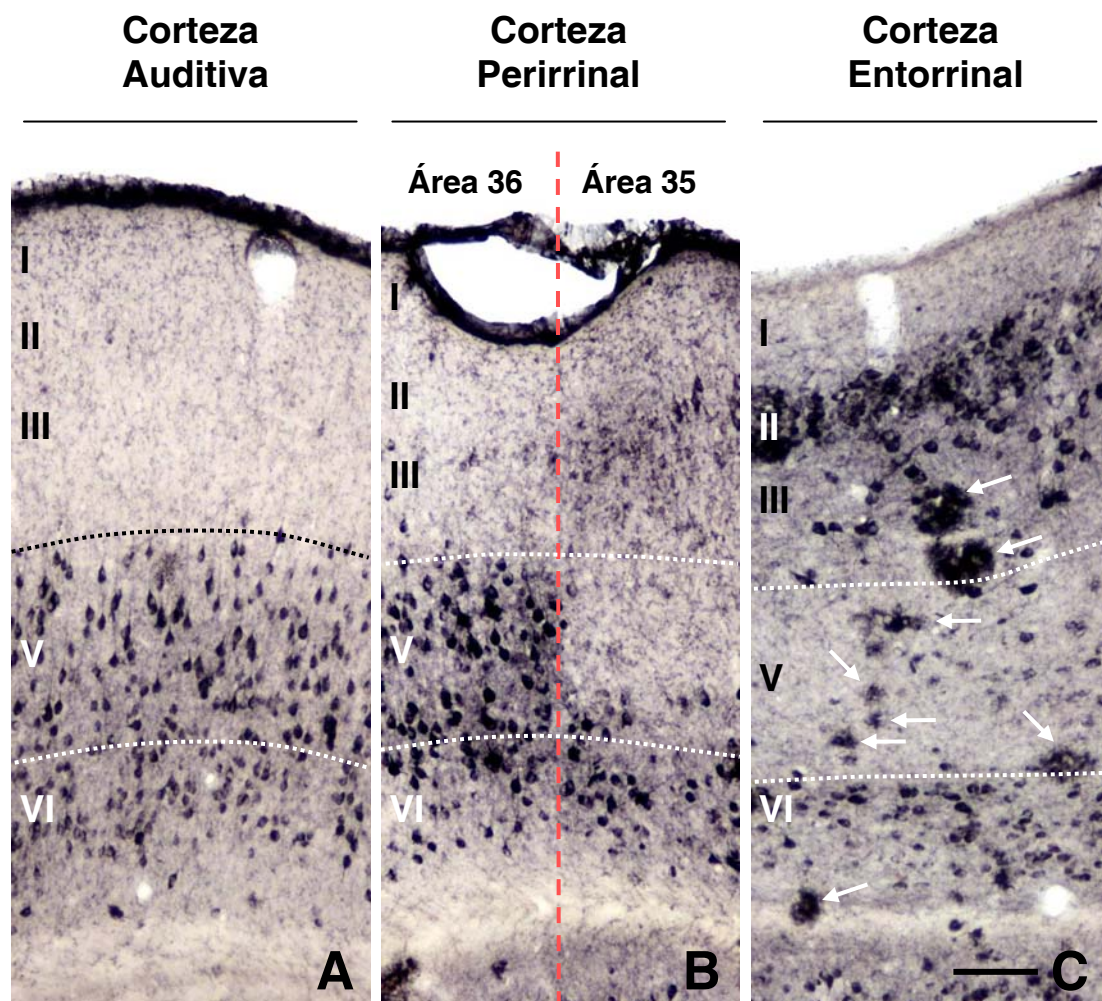


Figura 3.55. Patrón de inmunorreactividad laminar diferencial para 6E10 en la corteza auditiva (A), perirrinal (B) y entorrinal (C) en animales PS1xAPP de 6 meses de edad. En corteza auditiva y perirrinal (área 36), la inmunotinción para 6E10 se localiza en neuronas de capas profundas (V y VI). Sin embargo, en corteza entorrinal y el área 35 de la corteza perirrinal, la inmunotinción se localiza en capas superficiales (II y III) y capa VI. La gran mayoría de las neuronas de capa V de corteza entorrinal y perirrinal 35 no son inmunorreactivas para este anticuerpo, por lo tanto, no expresan hAPP ni sus derivados proteolíticos, incluido el A β . En corteza perirrinal se observa claramente una transición brusca entre el área 36 y 35, de tal forma que las neuronas de capa V aparecen fuertemente inmunoteñidas en el área 36, mientras que las del área 35 son inmunonegativas. A esta edad, las placas amiloides extracelulares se detectan en corteza entorrinal (flechas) pero no en corteza auditiva ni perirrinal. Barra de escala: 100 μ m.

esta edad, ya se aprecia la presencia de placas inmunorreactivas en la corteza entorrinal (que se ve afectada antes que las otras regiones corticales). Es de destacar el límite bien definido que existe entre las regiones 35 y 36 perirrinales en relación a la capa V, intensamente marcada en 36 e inmunonegativa en la 35. De igual forma, la capa V de la corteza entorrinal es inmunonegativa para 6E10.

En resumen, las neuronas principales de capa V de corteza entorrinal, junto con las del área 35 perirrinal, son selectivamente inmunonegativas para 6E10, al contrario que en otras regiones corticales. Aunque desconocemos el origen de estas diferencias laminares entre cortezas, posiblemente sea debido a la diferente naturaleza de estas neuronas. En este sentido, es de destacar que las neuronas de capa V de neocorteza constituyen la principal fuente de eferencias corticales, mientras que, en corteza entorrinal, son las de capa II y III.

3.2.7. No existe acumulación de β -amiloide intracelular a edades tempranas en ninguna de las capas de la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP

Una vez determinada que la inmunorreactividad intraneuronal para 6E10 se localizaba específicamente en capas II, III y VI, y no en la capa V (donde existe muerte de células principales), quisimos comprobar si se debía a una acumulación de A β intracelular o, en realidad, era debido a un posible reconocimiento de las formas precursoras, ya que el anticuerpo 6E10 reconoce la secuencia aminoacídica 1-17 del A β , presente en la secuencia del APP y en el fragmento producto de la proteólisis, denominado C99. Para este fin, realizamos un triple marcaje fluorescente en la misma sección empleando los anticuerpos 6E10, hAPP y el marcador de núcleos DAPI. Como puede observarse en las fotografías de un animal PS1xAPP de 2 meses de edad (Fig. 3.56), la totalidad de las neuronas principales marcadas con 6E10 también aparecían marcadas para APP, existiendo, por lo tanto, una coincidencia total entre ambos anticuerpos a nivel somático. A nivel de neuropilo, el anticuerpo 6E10 mostraba un marcaje mayor que el anticuerpo para hAPP, claramente visible en la cápsula externa, indicando la posible presencia de A β a nivel axonal. A 4 meses de edad (Fig. 3.57), el inmunomarcaje con 6E10 y con hAPP fue de nuevo coincidente en las neuronas, aunque el solapamiento intracelular de ambos anticuerpos no fue total. Esto podría indicar que, por un lado, 6E10 reconoce ampliamente APP y sus derivados, pero también reconoce el A β que se forma en estas células, aunque este no parece estar acumulándose. Además, 6E10 de nuevo marcaba más intensamente las fibras del neuropilo que el anticuerpo contra hAPP, sobre todo en la capa molecular I, debido, probablemente, al transporte axonal del A β . Sin embargo, el anticuerpo hAPP marcaba más intensamente las neuritas distróficas que aparecían alrededor de los depósitos extracelulares, marcados únicamente con 6E10 (ver serie E). Otra vez pudimos constatar que sólo una pequeña minoría de las neuronas que aparecen en la capa V de la corteza entorrinal expresaban la forma mutada hAPP y, por lo tanto, sólo unas cuantas de ellas aparecían marcadas con el anticuerpo 6E10 aunque, como puede comprobarse con el marcador DAPI (específico de núcleos), existía una gran cantidad de neuronas presentes en dicha capa. Es por este

motivo por el que ni el marcaje con hAPP ni con 6E10 nos garantizaba la observación de A β intracelular (excepto el que se estaba sintetizando) en concentraciones que pudieran ser tóxicas para la célula, ya que no llegaba a acumularse intracelularmente, como veremos más adelante. En apoyo a la ausencia de acumulación de A β en la corteza entorrinal, observamos además la carencia de marca intracelular con Tioflavina S y rojo congo.

No se descartaba la posibilidad de que se estuviera acumulando formas oligoméricas a nivel intracelular. Teniendo en cuenta que NU4 podría estar reconociendo también otras moléculas, incluidos los precursores de A β , se realizó un doble marcaje APP/NU4 en animales PS1xAPP de 4 meses de edad. Las imágenes de microscopía epifluorescente (Fig. 3.58 A-C) mostraron una co-localización prácticamente total de ambos marcadores en las neuronas principales de capa II, III, V y VI, al igual que observamos con 6E10/APP. Además, las neuritas distróficas alrededor de las placas marcadas con APP también eran reconocidas por el anticuerpo NU4, aunque existían algunas zonas en los depósitos extracelulares que sólo fueron reconocidas por NU4. En las imágenes de pseudo-3D de microscopía confocal (Fig. 3.58 D y E) se muestran varias neuronas pertenecientes a las capas profundas (capa VI) de la corteza entorrinal que aparecían inmunopositivas para ambos marcadores, aunque pueden apreciarse zonas intracelulares marcadas únicamente con el anticuerpo NU4, lo que indica que existían pequeñas cantidades de A β oligomérico (probablemente relacionadas con su formación y no por su acumulación) en el interior de las somas de estas neuronas.

Para conocer exactamente en qué compartimentos subcelulares se encontraban las formas oligoméricas del A β que reconocía el anticuerpo NU4 en el interior neuronal, se realizaron varios experimentos para microscopía confocal empleando el anticuerpo NU4 y varios marcadores de compartimentos subcelulares implicados en la síntesis de A β , como son GRP-94 para retículo endoplasmático, GM-130 para las cisternas de la cara cis del aparato de Golgi, TGN-38 para la red trans Golgi, EEA1 para endosomas tempranos y LAMP2 para lisosomas, como se muestra en el esquema de la Fig. 3.59 A, en animales doble transgénicos PS1xAPP de 6 meses de edad. La inmunohistoquímica doble para GRP-94/NU4 (Fig. 3.59 B) mostró que no co-localizaban a nivel subcelular, por lo que las formas oligoméricas no estaban dentro del retículo. Sin embargo, sí existía una clara co-localización de NU4 con los anticuerpos para las dos caras del aparato del Golgi (Fig. 3.60), siendo más extensa la colocalización en el trans Golgi. También se encontró co-localización entre los marcadores de endosomas tempranos y lisosomas con el anticuerpo NU4 (Fig. 3.61). Este marcaje aparecía con morfología vesicular, muy marcada sobre todo para los endosomas, mientras que en las microfotografías para lisosomas el marcaje era menor, posiblemente debido a la pérdida de conformación del amiloide dentro de estas vesículas.

En resumen, con esta serie de experimentos habíamos demostrado que las capas II, III y VI expresaban hAPP y, consecuentemente, sintetizaban A β , incluidas formas oligoméricas. Sin embargo, en ningún caso se puede concluir que estas células acumulen A β . Las neuronas de capa V no expresan hAPP y, por lo tanto, no sintetizan ni acumulan A β intracelularmente. Aun así, y dado que los anticuerpos 6E10 y NU4 parecen estar reconociendo también formas precursoras, para poder estar completamente seguros de que

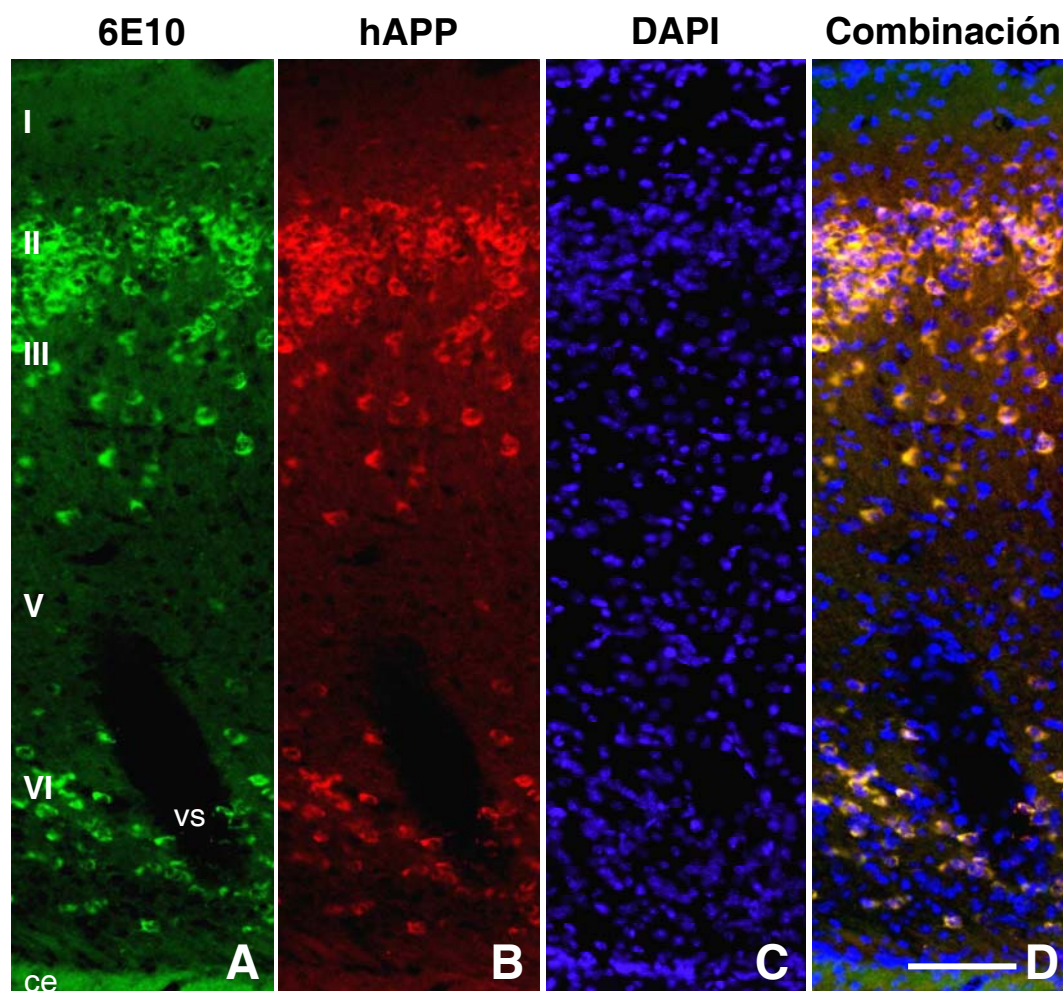


Figura 3.56. Los anticuerpos 6E10 y hAPP-CTF marcan las mismas poblaciones neuronales. **Marcaje triple 6E10/APP/DAPI en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 2 meses de edad.** Las imágenes del triple marcaje para microscopía de fluorescencia muestran solapamiento en el marcaje somático para los anticuerpos 6E10 (A) y hAPP (B), como se demuestra en la imagen combinada (D). Numerosas neuronas doblemente marcadas con 6E10 y hAPP se localizan en capas II, III y VI, mientras que muy pocas aparecen en capa V. El neuropilo, sobre todo en capa I y más aún la cápsula externa (ce), se marca específicamente con 6E10. La laminación de las capas de la corteza entorrinal con DAPI (marcador nuclear) se muestra en la imagen C. Microscopía de epifluorescencia. vs: vaso sanguíneo. Barra de escala: 100 μ m.

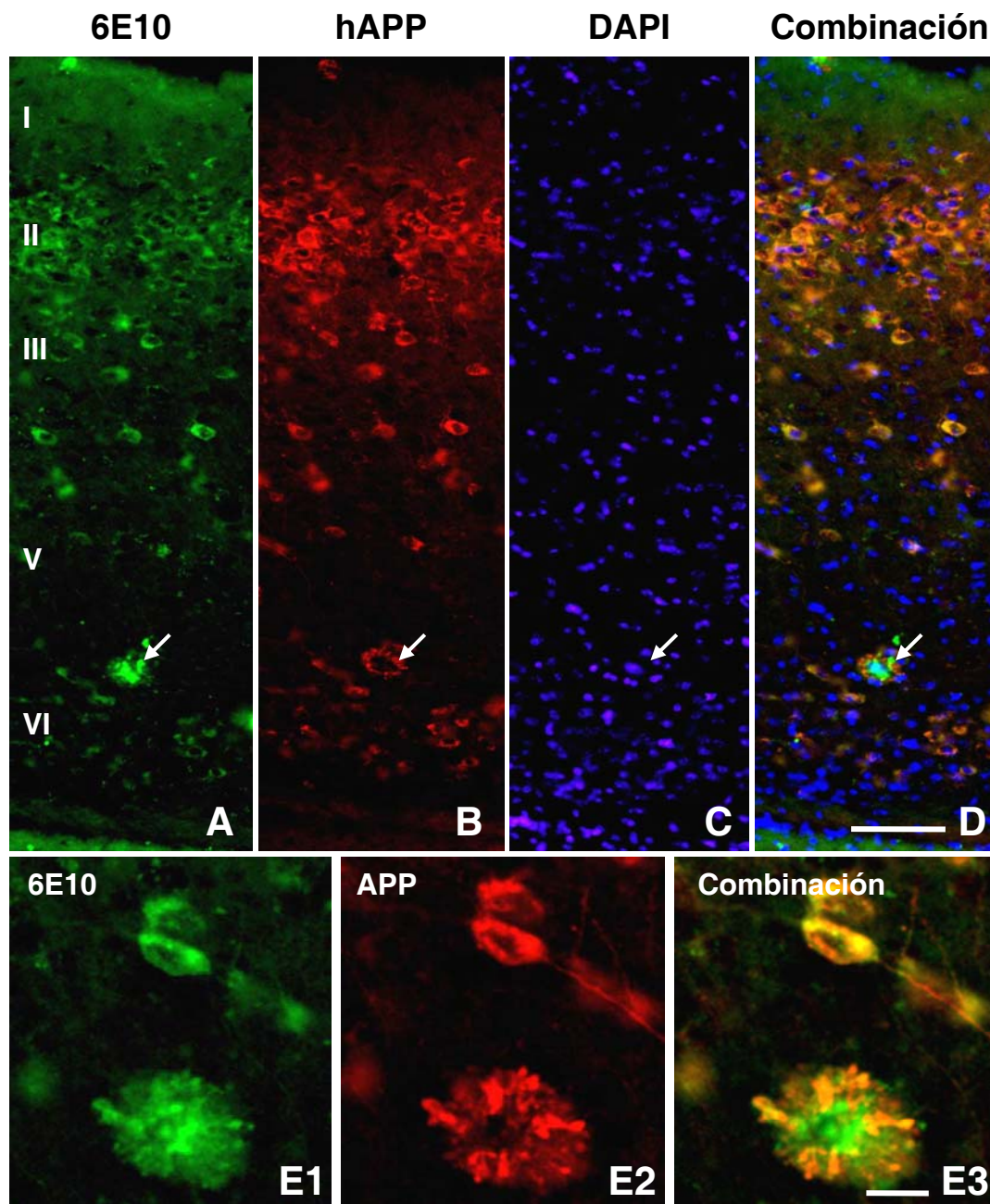


Figura 3.57. Marcaje triple 6E10/APP/DAPI en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 4 meses de edad. A los 4 meses, la inmunotinción para 6E10 (A) y hAPP (B) se localiza en los mismos cuerpos neuronales, al igual que a 2 meses, como muestra la imagen combinada (D). A esta edad, se puede apreciar alguna placa amiloide (flecha en A) en las capas profundas rodeada de neuritas distróficas hAPP-positivas (flecha en B), tal y como muestra la imagen combinada (D) y en las imágenes de detalle (serie E). La laminación de la corteza entorrinal con DAPI (marcador nuclear) se muestra en la imagen C. Microscopía de epifluorescencia. Barras de escala: 100 μ m (A-D); 25 μ m (E1-E3).

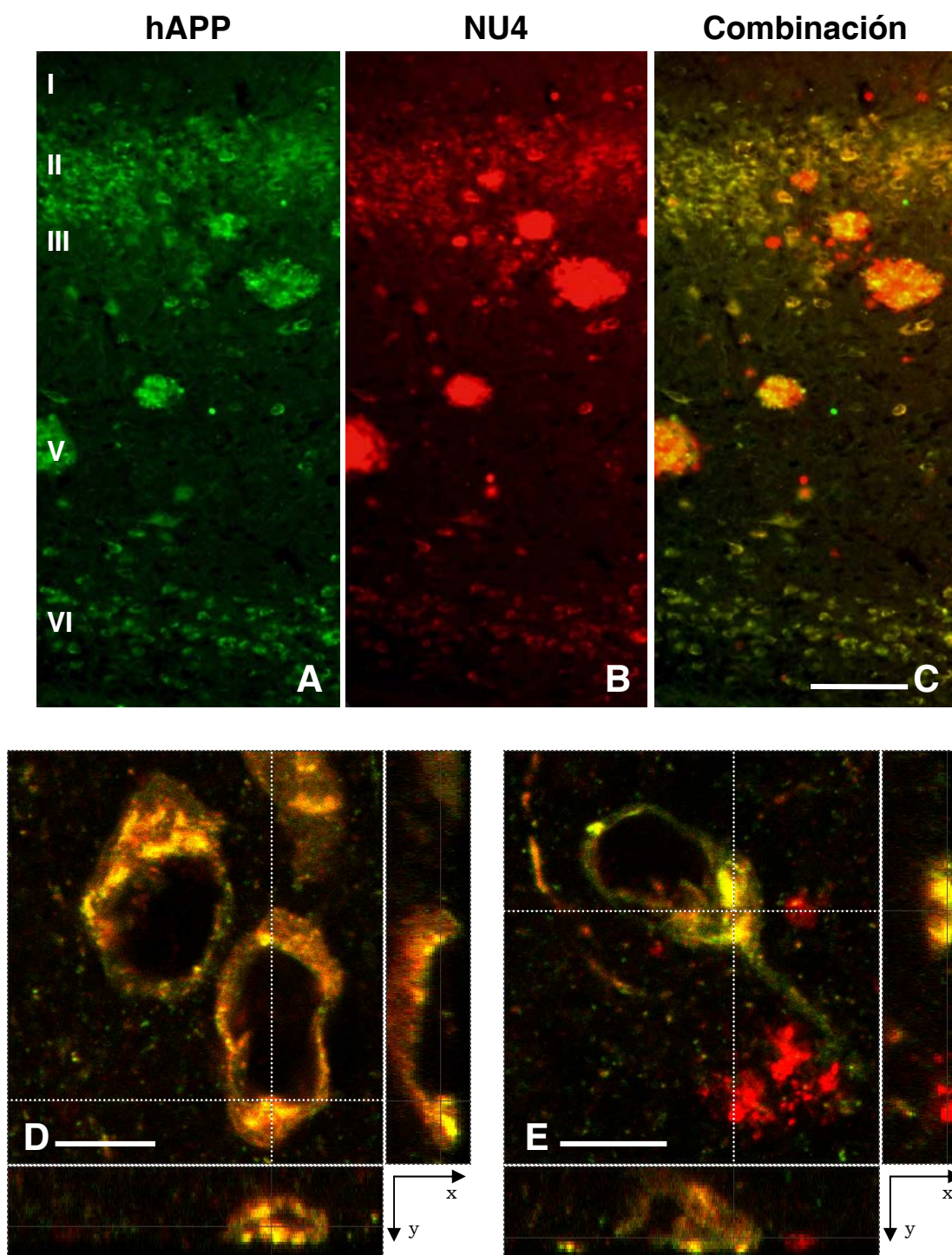


Figura 3.58. Inmunofluorescencia doble hAPP/NU4 en corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 4 meses de edad. **A-C)** El doble marcaje para hAPP y NU4 muestra que los somas neuronales que expresan la forma mutada hAPP también aparecen marcados con NU4. **D y E)** En las reconstrucciones pseudo-3D a microscopía confocal observamos que la colocalización a nivel intracelular de ambos anticuerpos no es total, sino que existen zonas rojas (NU4-positivas), amplias regiones amarillas (colocalización de ambos anticuerpos) y pequeñas zonas verdes (hAPP-positivas). Barras de escala: 100 μm (A-C); 10 μm (D y E).

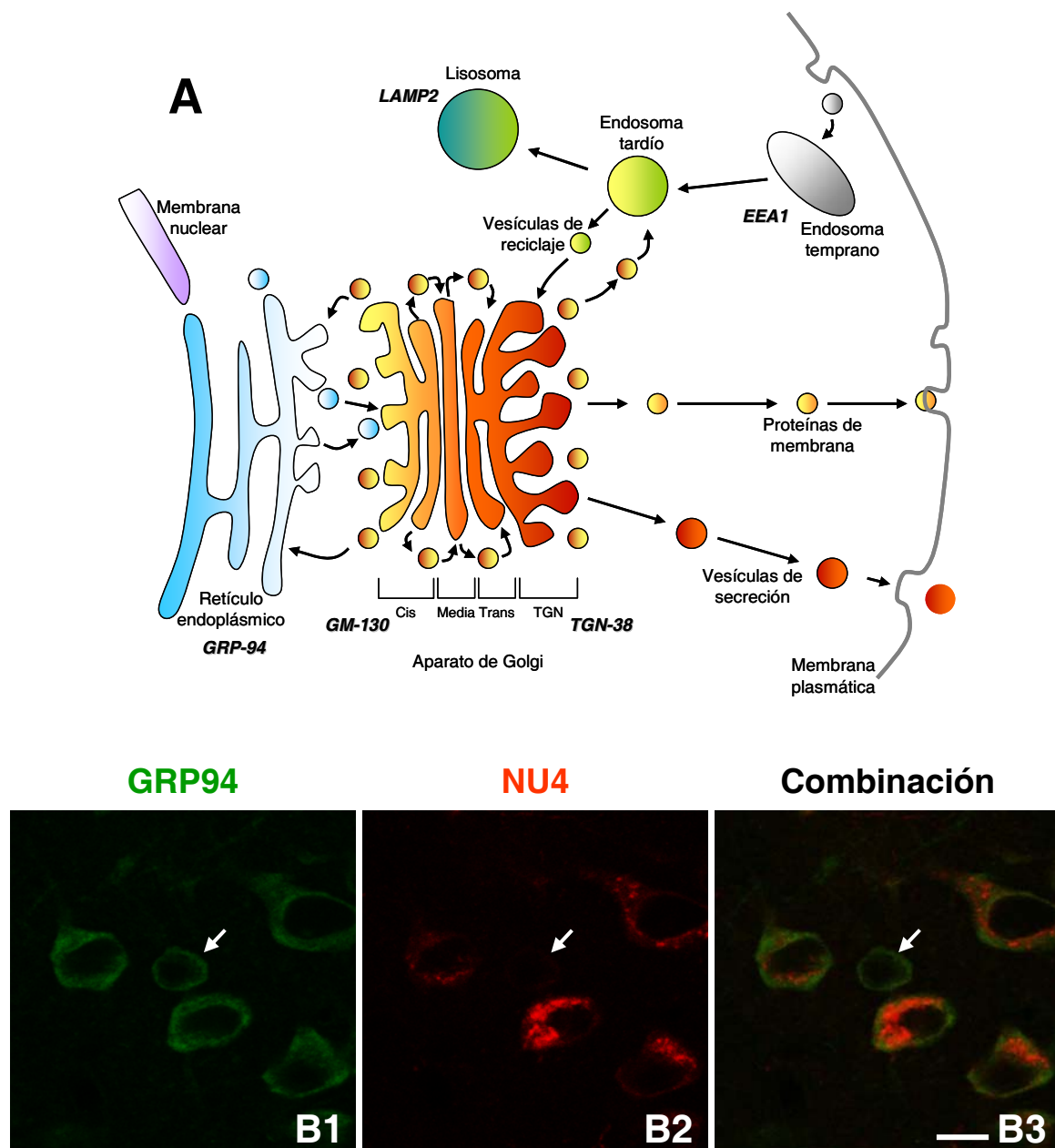


Figura 3.59. A) Esquema del tráfico vesicular intracelular. En este esquema se indican los marcadores de compartimentos subcelulares utilizados para localizar el A β oligomérico intracelular en el modelo transgénico PS1xAPP. B1-B3) Localización subcelular de A β oligomérico en el retículo endoplásmico. Inmunofluorescencia doble GRP94/NU4 para microscopía confocal en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP a 2 meses de edad. El marcaje con los anticuerpos GRP94 (chaperona específica de retículo endoplásmico, B1) y NU4 (forma oligomérica amiloide, B2) no muestra un alto grado de co-localización intracelular. La flecha señala una neurona inmunonegativa para NU4 (probablemente una interneurona). Barra de escala: 10 μ m.

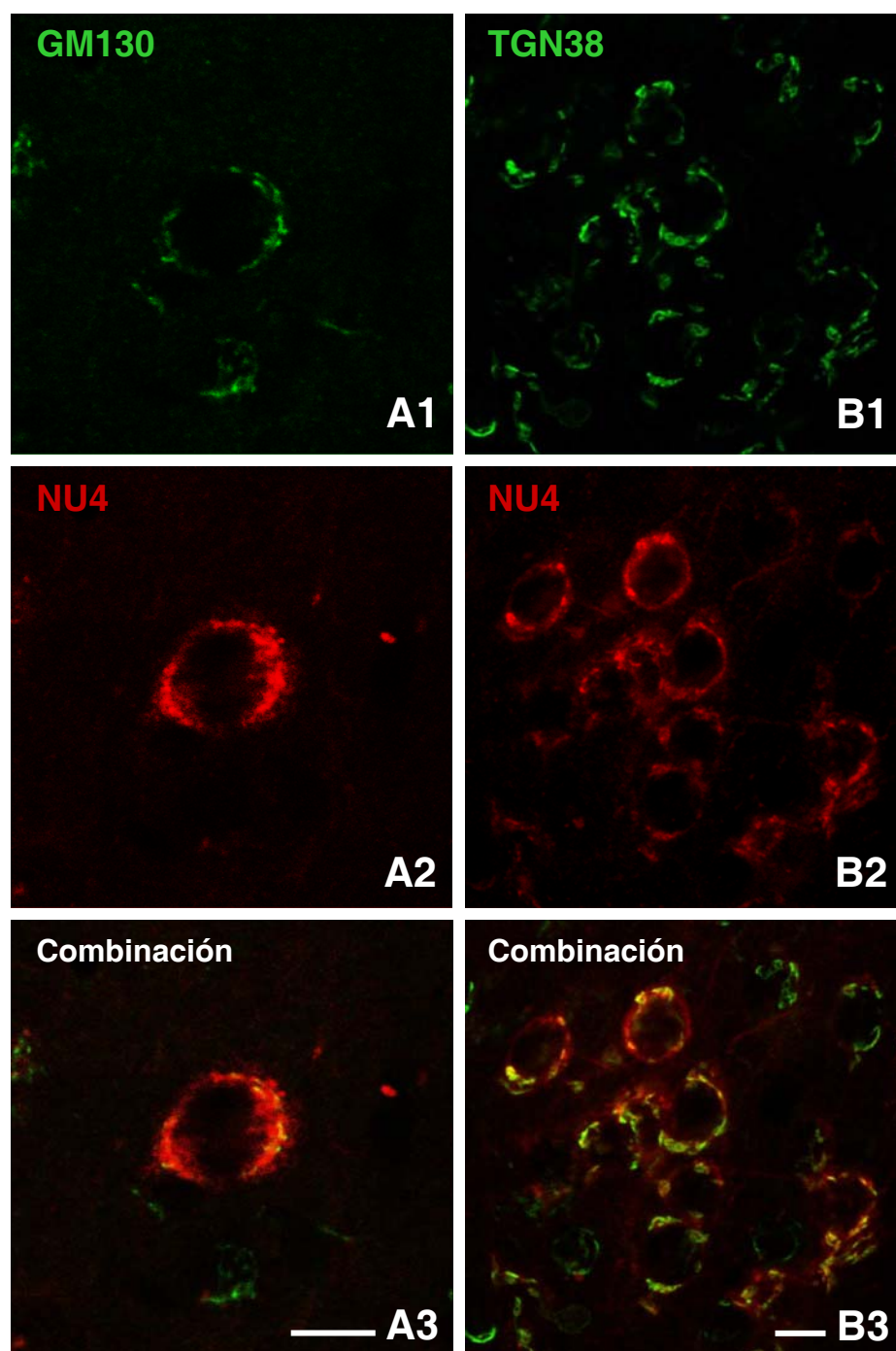


Figura 3.60. Localización subcelular de A β oligomérico en el complejo de Golgi. Inmunofluorescencia doble para microscopía confocal con marcadores del Golgi (A1 y B1) y NU4 (A2 y B2) en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 4 meses de edad. **A1-A3)** Existe sólo una pequeña colocalización entre el marcador GM130, proteína estructural específica de las cisternas cis del Golgi, y el marcador de amiloide oligomérico NU4. **B1-B3)** Sin embargo, existe una extensa colocalización subcelular entre la proteína integral de membrana de la red del trans Golgi (TGN38) y NU4 en las neuronas principales. Barras de escala: 10 μ m (A y B).

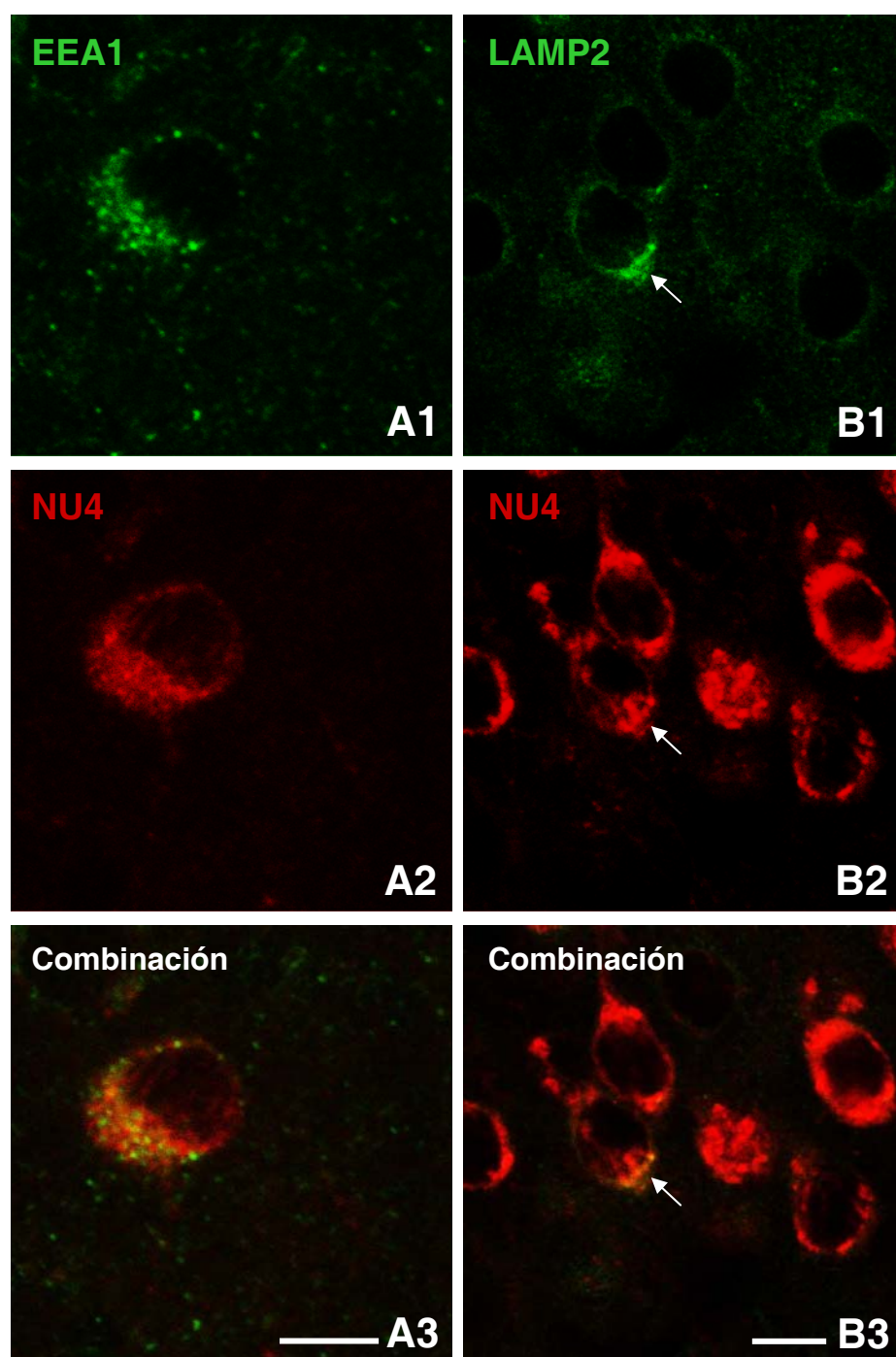


Figura 3.61. Localización subcelular de A β oligomérico en endosomas tempranos y lisosomas. Inmunofluorescencia doble EEA1/NU4 (A1-A3) y LAMP2/NU4 (B1-B3) en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 4 meses de edad. En la serie A, se muestra que existe una colocalización parcial entre la proteína de membrana de endosomas tempranos EEA1 y el marcador de amiloide oligomérico NU4. En la serie B, las imágenes de microscopía confocal muestran una escasa colocalización (flecha en B3) entre LAMP2, proteína de membrana asociada a lisosomas, y NU4. Barras de escala: 10 μ m (A y B).

en la corteza entorrinal no existía acumulación de A β intraneuronal, decidimos utilizar el anticuerpo A β ₄₂ tras el tratamiento de las secciones con ácido fórmico (para extraer los epítopes de A β) en animales PS1xAPP de edades tempranas (Fig. 3.62). Los resultados demostraron que el tratamiento previo con ácido fórmico al 85% produce, sin lugar a dudas, un incremento de la inmunorreactividad y de la intensidad en el inmunomarcaje para A β ₄₂ en comparación con la ausencia de pretratamiento, tal y como se muestra en secciones consecutivas de animales de 4 (Fig. 3.62 A y B) y 6 (Fig. 3.62 C y D) meses de edad. En regiones afectadas por el depósito amiloide, como son el hipocampo y la corteza en general y, en particular, la corteza entorrinal, el número de placas y la intensidad de marcaje de las mismas, fue muchísimo mayor en las secciones tratadas con ácido fórmico. A nivel celular, en animales de 2, 4 y 6 meses de edad (Fig. 3.63) no se observó inmunotinción intracelular de A β ₄₂ en ninguna de las capas de la corteza entorrinal. Por el contrario, a los 2 meses de edad, se encontró marcaje intracelular en otras regiones, como son el subículo y la corteza motora (Fig. 3.64). En el subículo, la marca intracelular aparecía principalmente en la capa piramidal, mientras que, en la corteza motora, el depósito intracelular punteado aparecía únicamente en las neuronas de capa V.

Estos resultados indican que en nuestro modelo animal no existe acumulación de A β intraneuronal en la corteza entorrinal, al menos a edades tempranas, que justifique la muerte neuronal observada a los 6 meses de edad, como se ha descrito para otros modelos animales. Sin embargo, en otras regiones corticales sí existe acumulación temprana de A β intracelular, como es la corteza motora y, en concreto, las neuronas de capa V. Para determinar si esta acumulación conllevaba a la muerte temprana de estas neuronas, realizamos un estudio cuantitativo de la densidad neuronal de la capa V de la corteza motora a los 6 meses de edad en animales PS1xAPP y WT. Los resultados mostraron la ausencia de cambios significativos ($167,92 \pm 27,44 \times 10^3$ vs. $188,02 \pm 60,36 \times 10^3$ neuronas/mm³ para WT y PS1xAPP respectivamente; n=5/genotipo), indicando que no existe pérdida neuronal temprana en esta región cortical a pesar de la acumulación de A β intraneuronal por parte de estas células desde los 2 meses de edad. Por lo tanto, deben ser factores extracelulares los que induzcan neurodegeneración en nuestro modelo. Entre estos factores, como posibles candidatos están el A β extracelular y el proceso neuroinflamatorio.

3.3. Proceso neuroinflamatorio temprano en la corteza entorrinal del modelo PS1xAPP. Papel de las células gliales

Actualmente, el proceso neuroinflamatorio se puede considerar como otra de las marcas patológicas de la enfermedad de Alzheimer. Aunque la respuesta inflamatoria se desencadena como un mecanismo de defensa contra un proceso nocivo, puede llegar a producir más efectos perjudiciales que beneficiosos cuando se convierte en un proceso crónico y deja de estar bajo. El posible papel dual que juega la respuesta inflamatoria en la enfermedad de Alzheimer y su participación en la muerte/supervivencia neuronal no es bien conocido. En el hipocampo de nuestro modelo transgénico se produce un cambio del perfil inflamatorio dependiente de la edad, de tal forma que a edades tempranas (4-6 meses) es

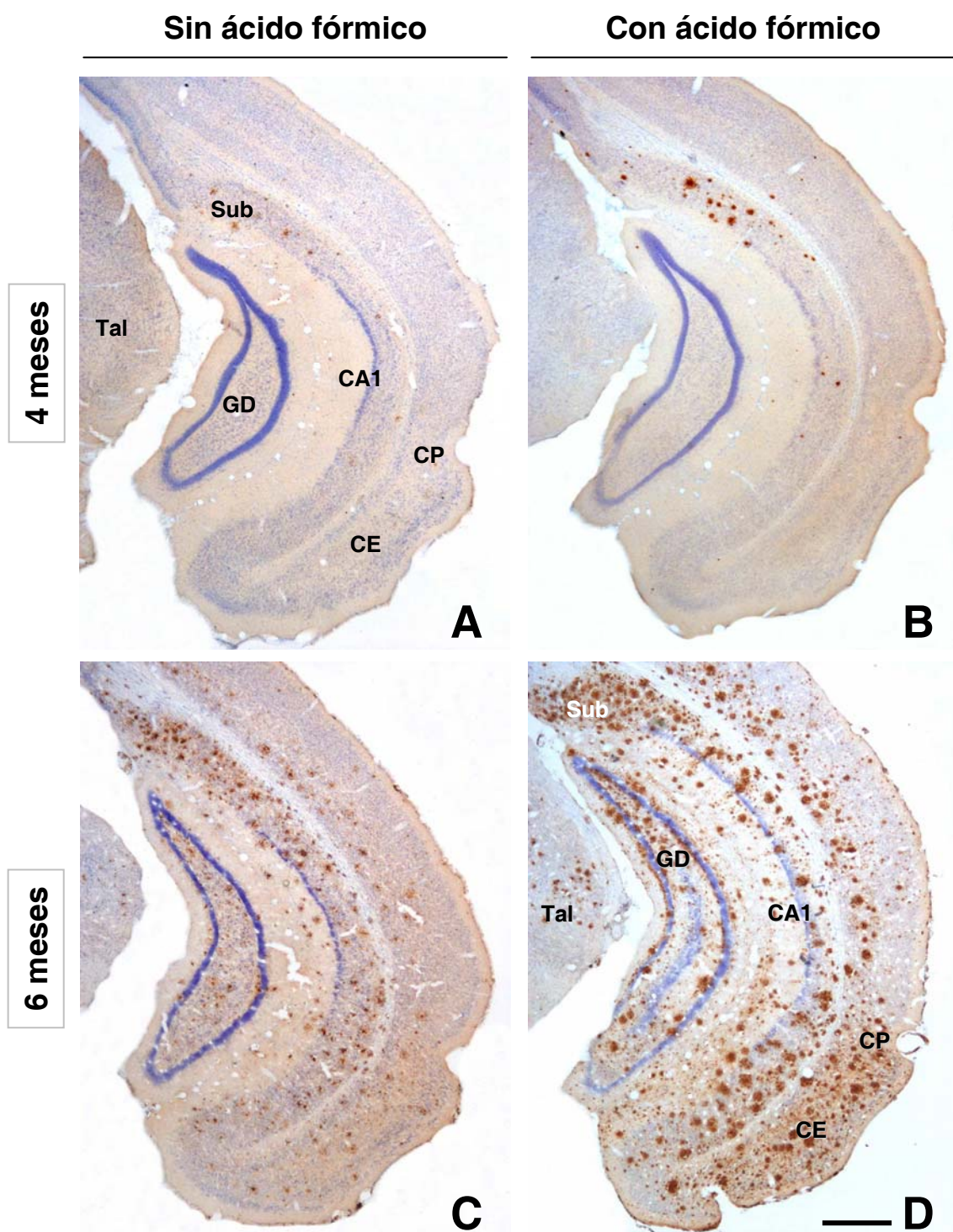


Figura 3.62. Intensificación del epítipo de $A\beta_{42}$ mediante el empleo de ácido fórmico. Inmunohistoquímica para $A\beta_{42}$ y contratinción con violeta de cresilo en animales PS1xAPP 4 (A y B) y 6 (C y D) meses de edad. Para conocer si el tratamiento con ácido fórmico incrementa el inmunomarcage con $A\beta_{42}$ en nuestros animales, hemos realizado una inmunohistoquímica para $A\beta_{42}$, con y sin pretratamiento con ácido fórmico al 85%, en los mismos animales de 4 y 6 meses de edad. A ambas edades, existe un incremento notable de la intensidad del inmunomarcage tras el empleo de ácido fórmico (B y D) en comparación con las muestras sin pretratar (A y C). Barra de escala: 500 μ m (A-D). Sub: subículo; CA1: área del hipocampo; GD: giro dentado; CP: corteza perirrinale; CE: corteza entorrinal; Tal: tálamo.

Corteza entorrinal

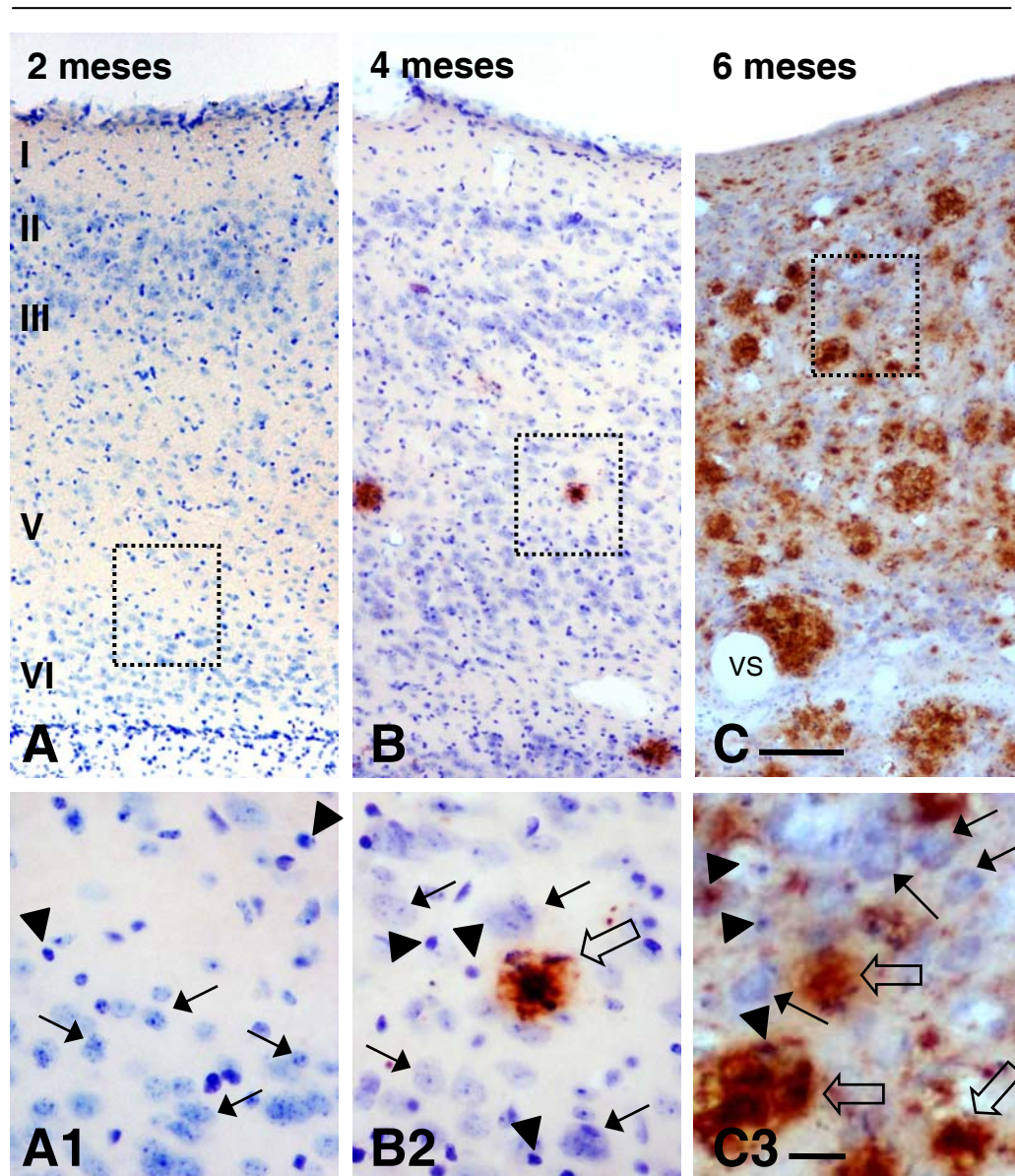


Figura 3.63. El $A\beta$ no se acumula intracelularmente en la corteza entorrinal a edades tempranas. Inmunohistoquímica para $A\beta_{42}$ y contratinción con violeta de cresilo de animales PS1xAPP de la corteza entorrinal a 2 (A), 4 (B) y 6 (C) meses de edad. A los 2 meses de edad, no existe marcaje con el anticuerpo $A\beta_{42}$ en la corteza entorrinal (A). A los 4 meses, comienzan a aparecer placas extracelulares (flechas abiertas) en las capas profundas (B). El inmunomarcaje con anti- $A\beta_{42}$ a los 6 meses (B) aparece en toda la columna cortical, pero no se observa marcaje intracelular en las neuronas (flechas) ni en las células gliales (cabezas de flecha) a ninguna edad. vs: vaso sanguíneo. Barras de escala: 100 μm (A-C); 20 μm (C-D).

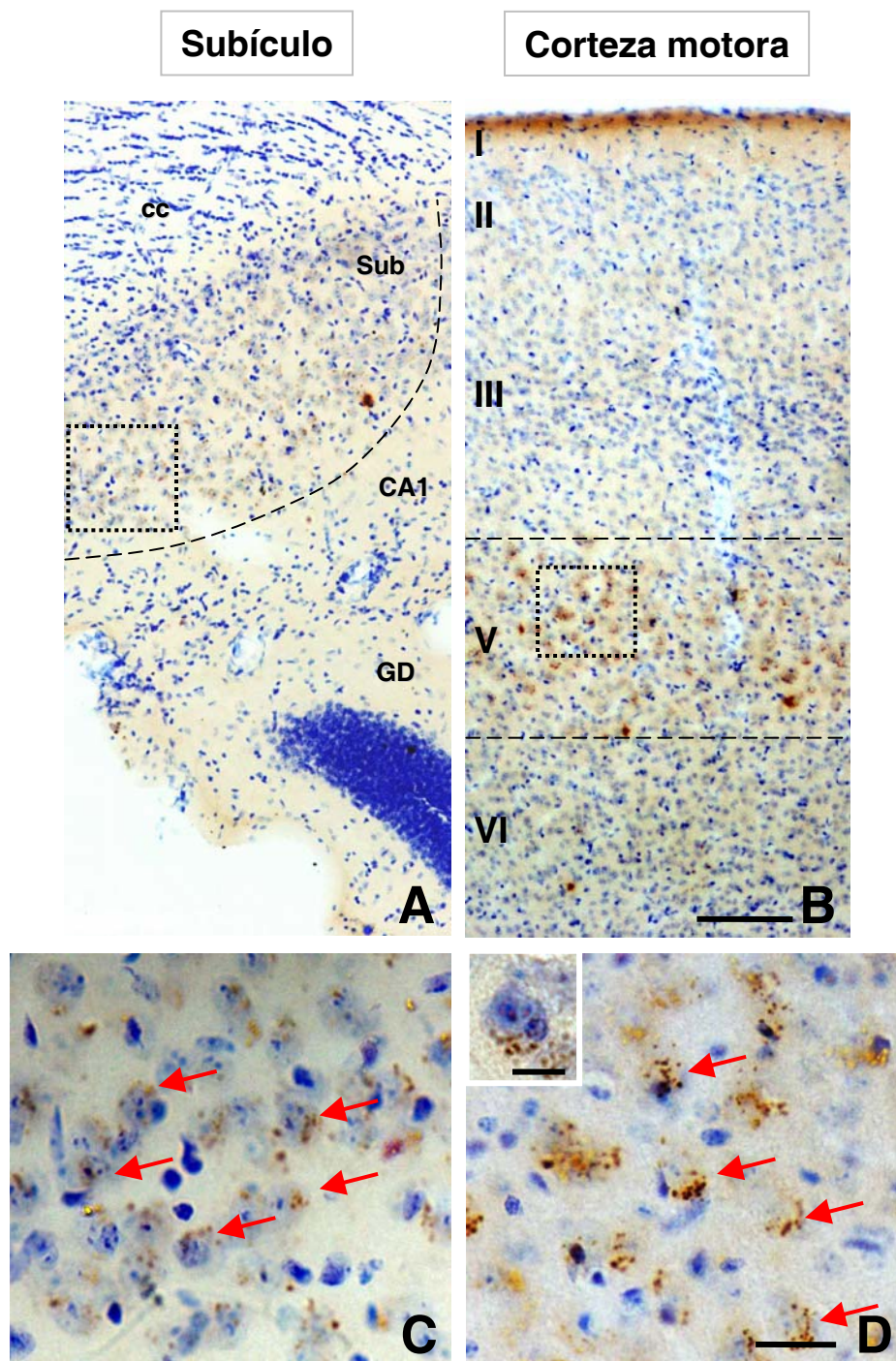


Figura 3.64. El A β se acumula intracelularmente en el subículo (A y C) y la corteza motora (B y D). Inmunohistoquímica para A β_{42} y contratinción con violeta de cresilo en animales PS1xAPP a 2 meses de edad. El inmunomarcaje con anti-A β_{42} , tras el tratamiento con ácido fórmico, aparece con un aspecto punteado en el interior de algunos cuerpo neuronales a los 2 meses de edad en el subículo (A) y en la capa V de la corteza motora (B). Las fotos de detalle de los cuadros mostrados en A y B, muestran el marcaje intracelular con A β_{42} (flechas) en las neuronas marcadas con violeta de cresilo. Sub: subículo; CA1: región del hipocampo; GD: giro dentado; cc: cuerpo calloso; números romanos: capas de la neocorteza. Barras de escala: 100 μ m (A y B); 20 μ m (C y D); 10 μ m (inserto en D).

de naturaleza beneficiosa, mientras que a edades avanzadas (18 meses) es neurotóxica (Jimenez y col., 2008). Teniendo en cuenta que en la corteza entorrinal existe muerte neuronal de células principales desde edades muy tempranas, es posible que el transcurso del proceso inflamatorio en esta región cortical sea diferente al del hipocampo.

3.3.1. Existe activación glial temprana en la corteza entorrinal coincidente con la aparición de los depósitos amiloides

Para determinar si existía un proceso inflamatorio temprano en nuestro modelo PS1xAPP, en primer lugar se estudió la expresión del ARNm de marcadores gliales, como son CD11b (células microgliales) y GFAP (astrocitos), en muestras micro-disecionadas de la corteza entorrinal de animales PS1xAPP, PS1 y WT a 4 y 6 meses de (Fig. 3.65). Los resultados mostraron un incremento significativo para CD11b ($3,46 \pm 0,62$ veces, $n=4$; Tukey $p<0,001$) y aún más para GFAP ($12,24 \pm 0,86$ veces, $n=4$; Tukey $p<0,001$) en los animales PS1xAPP de 6 meses de edad respecto a los controles de la misma edad. En el caso del marcador GFAP, también se observó un incremento significativo a los 4 meses de edad ($2,22 \pm 0,67$ veces, $n=4$; Tukey $p<0,05$). Para el ARNm de CD11b se apreció un ligero aumento a los 4 meses, aunque no llegó a ser estadísticamente significativo. Este aumento temprano de los niveles de ARNm para CD11b y GFAP coincidió temporalmente con la aparición de las placas amiloides en este modelo animal.

La microglía representa la defensa inmune activa del sistema nervioso central. Es una población celular muy sensible a cualquier cambio patológico, ya que el cerebro es un órgano inmunológicamente privilegiado. El estudio celular de esta población glial se realizó mediante inmunohistoquímica, empleando el anticuerpo contra el receptor de membrana CD11b (específico tanto de microglía residente como activada). En la Fig. 3.66, se muestra el patrón de expresión temporal del marcador CD11b en animales WT y PS1xAPP a 2, 6 y 18 meses de edad. En los animales control el inmunomarcaje reveló la presencia de microglía con morfología típica residente (prolongaciones largas y delgadas altamente ramificadas) cuyo número y distribución fue constante en el tiempo. Sin embargo, en los animales doble transgénicos se detectó la presencia de microglía con morfología activada (cuerpo hipertrófico, prolongaciones cortas y gruesas) alrededor de los depósitos amiloides desde los 4 meses de edad, siendo bastante evidente a los 6 meses de edad. A los 6 meses también se apreció microglía activada en las regiones interplaca. A los 18 meses, los animales doble transgénicos presentaban casi la totalidad de la corteza entorrinal cubierta por microglía activada (alrededor de las placas y en las regiones interplaca). En la Fig. 3.67 se muestra con detalle el cambio de fenotipo microglial, de un estado residente o quiescente a un estado activado en los animales PS1xAPP, utilizando dos anticuerpos diferentes, anti-CD11b y anti-Iba1. De los dos anticuerpos, anti-Iba1 permitía reconocer de forma más precisa la morfología microglial y por ello empleamos este anticuerpo en un estudio más detallado para ver la relación de la microglía con las placas (Fig. 3.68). Así, pudimos apreciar a los 4 meses de edad la microglía activada alrededor de las placas y, además, la presencia de algunas células microgliales de aspecto parcialmente activado en las zonas

interplaca en las capas profundas de la corteza entorrinal. A los 6 meses, la microglía activada interplaca se extendía por toda la columna cortical (de forma más abundante en las capas profundas), mientras que los animales WT de la misma edad no presentaban activación microglial. Por lo tanto, el marcador Iba1 demostró ser mejor marcador que CD11b para revelar la morfología microglial y apreciar con más detalle las diferencias morfológicas en su estado quiescente o activado. La relación estrecha de la microglía activada con las placas se verificó también mediante dobles marcajes fluorescentes con CD11b/Tioflavina S o utilizando lectina de tomate/6E10 en secciones de corteza entorrinal de animales PS1xAPP (Fig. 3.69).

Por otro lado, se analizó el patrón de expresión de las células astrogiales mediante inmunohistoquímica, utilizando el anticuerpo anti-GFAP en los animales PS1xAPP a lo largo del envejecimiento (de 2 a 18 meses de edad). Mientras que a los 2 meses de edad no se observaron diferencias aparentes entre los animales control y los doble transgénicos (Fig. 3.70 A-C), a los 4 meses se detectó un incremento de la astrogía en los animales PS1xAPP en comparación con los animales WT y PS1 (Fig. 3.70 D-F). La astrogía en los transgénicos adquiría una morfología activada o reactiva, con un cuerpo celular hipertrófico y unas prolongaciones más gruesas y cortas. Algunas de estas células se disponían alrededor de las placas amiloides, aunque también se encontraban por toda la columna cortical. A los 6 y 18 meses de edad (Fig. 3.71), el patrón de distribución fue similar. Mientras los animales WT y PS1 presentaban una inmunotinción homogénea a lo largo de la columna cortical, con astrocitos no reactivos, los animales doble transgénicos mostraban toda la corteza cubierta por astrogía activada. La inmunofluorescencia doble GFAP/6E10 para microscopía confocal en animales PS1xAPP de 6 meses de edad (Fig. 3.72), puso de manifiesto que algunos de los astrocitos reactivos se encontraban alrededor e infiltrando con sus prolongaciones las placas amiloides.

Además, se analizó la activación glial en los animales doble transgénicos mediante el empleo de técnicas autorradiográficas con el radioligando ^3H -PK11195, específico de los receptores de benzodiazepinas periféricas (PBRs) localizados en la superficie glial. Las imágenes de cortes coronales rostrocaudales de animales PS1xAPP de 6 meses de edad (Fig. 3.73 A) mostraron, en dos escalas colorimétricas diferentes, un intenso marcaje en distintas zonas del encéfalo, como son la corteza prefrontal, el hipocampo, el subículo y las cortezas rinales, incluida la corteza entorrinal. La cuantificación de la actividad del radioligando medida en curios por minuto por unidad de área (cpm/mm^2) se muestra en el histograma de la Fig. 3.73 B. No se observaron diferencias significativas entre los animales control y PS1xAPP a los 2 meses de edad, aunque sí se observó un incremento significativo de $189,56 \pm 25,28\%$ (Tukey $p < 0,001$; $n=6$) en los animales PS1xAPP a los 6 meses de edad en el total de la corteza cerebral en comparación con los animales control. Este aumento no se obtuvo a los 4 meses (dato no mostrado).

Por lo tanto, desde los 4 meses de edad existe activación glial (microglía y astrogía) en la corteza entorrinal de este modelo PS1xAPP, coincidente temporal y físicamente con las placas de A β . Las regiones interplaca presentan también microglía activada y astrocitos reactivos a partir de los 6 meses de edad.

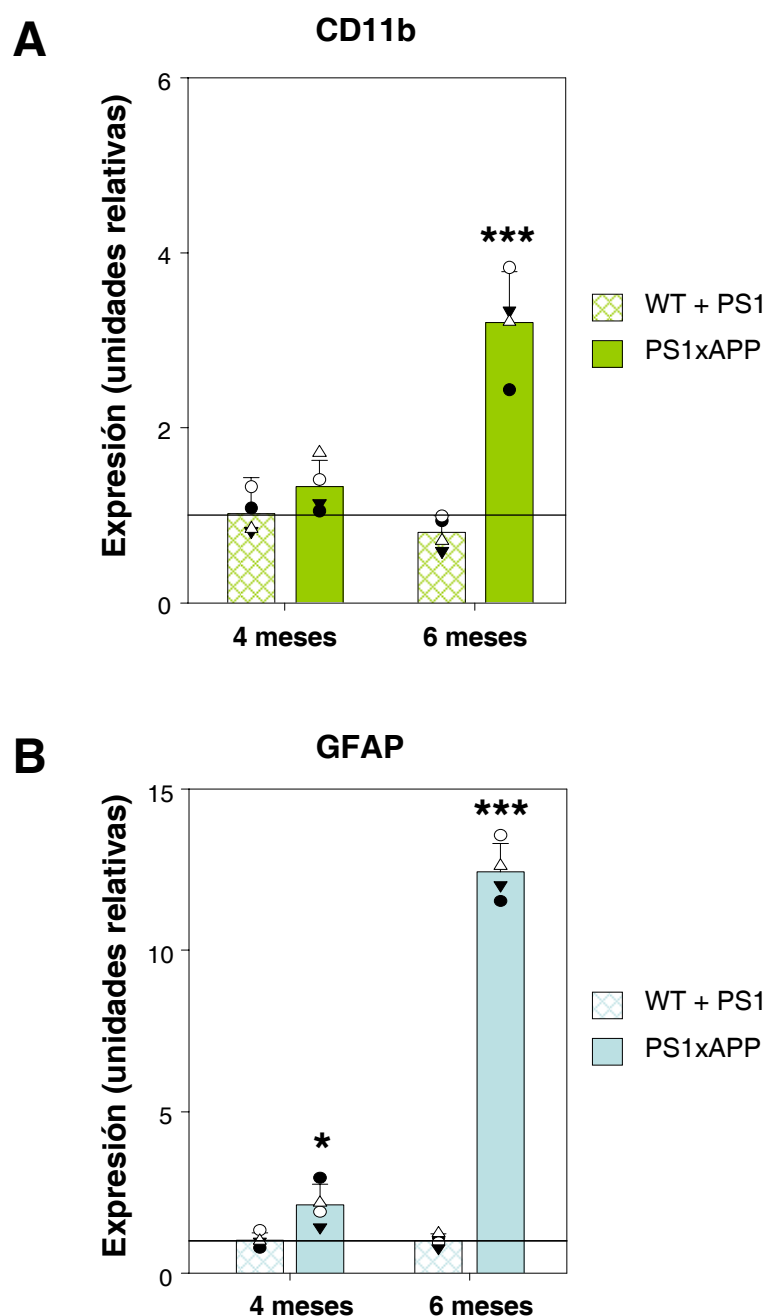


Figura 3.65. Activación glial en la corteza entorrinal a edades tempranas. Expresión del ARNm para CD11b (A) y GFAP (B) en animales WT, PS1 y PS1xAPP de 4 y 6 meses de edad.

La cuantificación mediante RT-PCR en muestras microdisseccionadas de corteza entorrinal muestra un incremento significativo para el ARNm de CD11b ($+320,18 \pm 57,87\%$) a los 6 meses de edad respecto a los animales WT y PS1 de la misma edad (ADEVA de una vía, $F(3, 12)=37,11$, $p<0,001$; Tukey $p<0,001$). En el caso del ARNm para GFAP, los animales PS1xAPP muestran un aumento significativo desde los 4 meses ($211,54 \pm 64,18\%$; Tukey $p<0,05$), que llega a ser hasta 12 veces superior a los 6 meses de edad ($1257,39 \pm 102,07\%$; Tukey $p<0,001$) en comparación con los controles de la misma edad (ADEVA de una vía, $F(3, 12)=386.83$, $p<0,001$). $n=4$; *** $p<0,001$; * $p<0,05$.

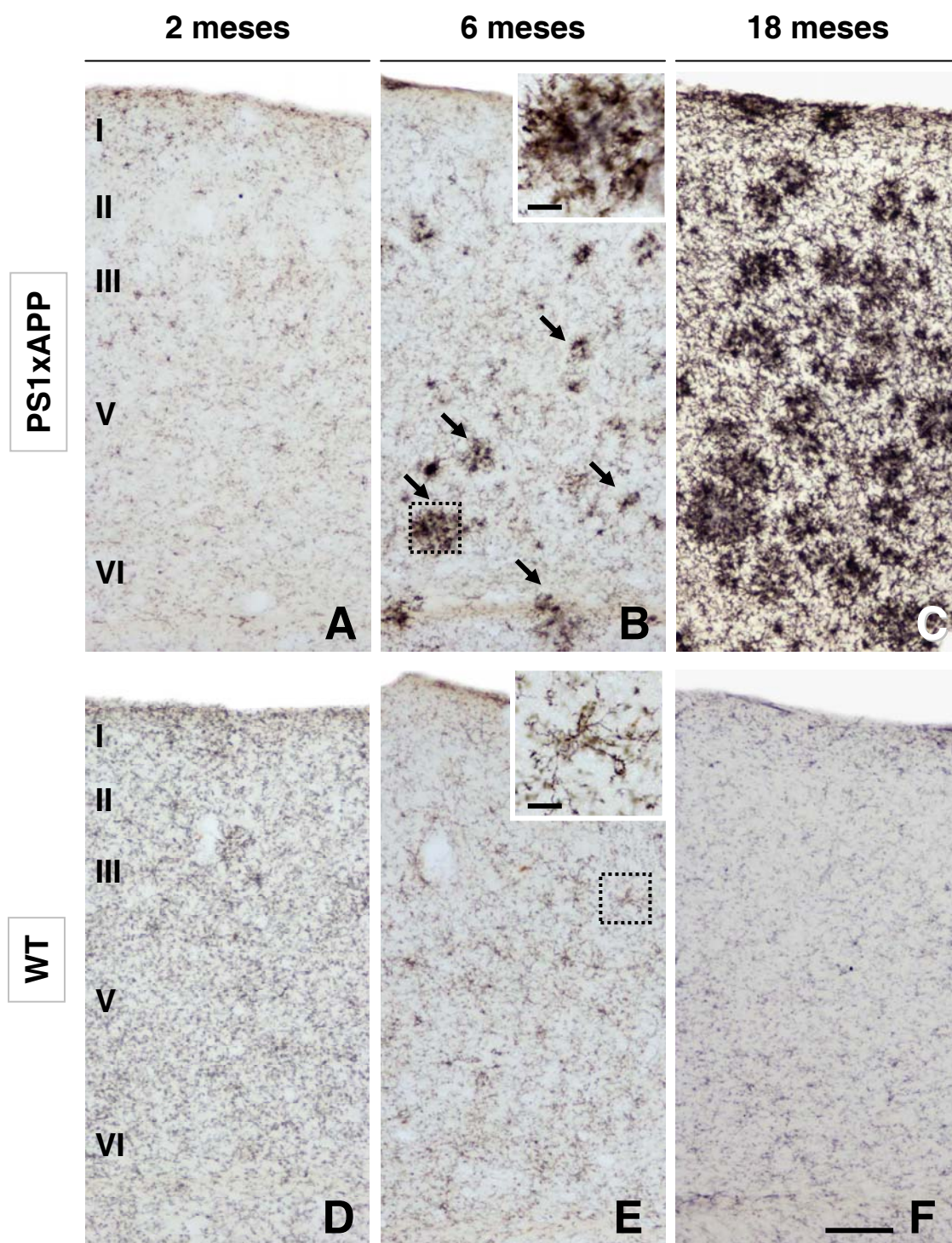


Figura 3.66. Patrón temporal de activación de la microglía en la corteza entorrinal. Inmunohistoquímica con anti-CD11b en animales PS1xAPP (A-C) y WT (D-F) de 2 (A y D), 6 (B y E) y 18 (C y F) meses de edad. Como se puede observar, existe un incremento de la microglía activada en los animales PS1xAPP con la edad. Las células microgliales activadas se localizan alrededor de las placas amiloides (flechas) entre los 4 y 6 meses de edad (inserto en B), y se expanden en las regiones interplaca a lo largo de toda la columna cortical entre los 12 y 18 meses del animal. En los animales WT se observan sólo células microgliales con morfología residente (inserto en E). Barras de escala: 100 μ m (A-F); insertos: 20 μ m.

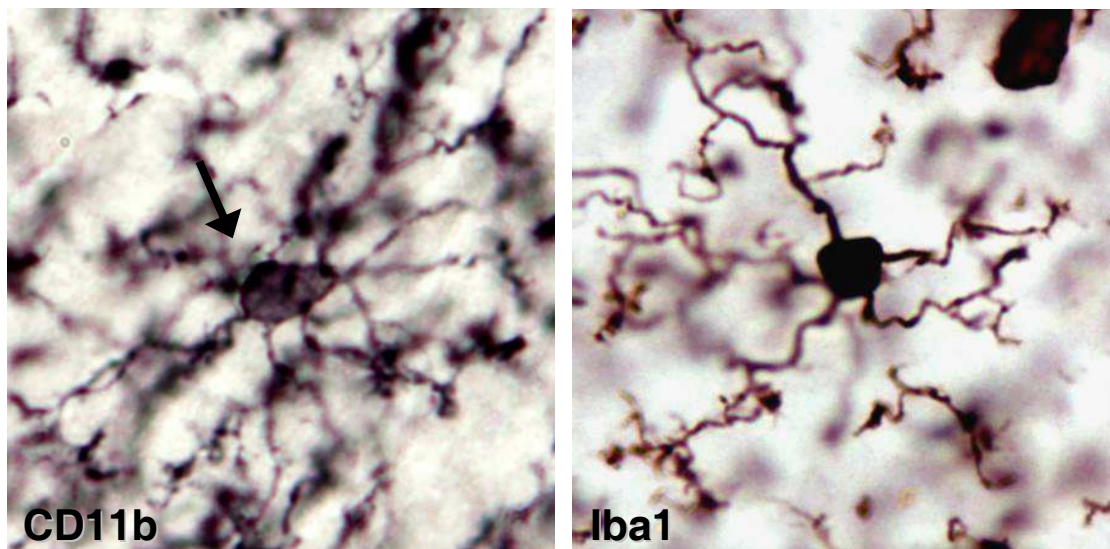
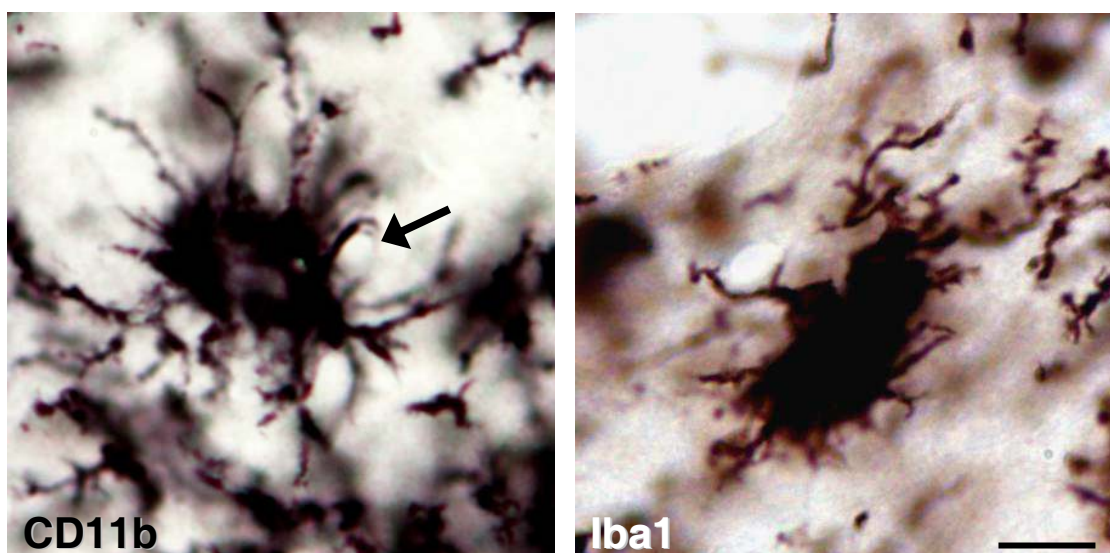
A. Microglía residente**B. Microglía activada**

Figura 3.67. Activación microglial en la corteza entorrinal a edades tempranas. Inmunohistoquímica para CD11b e Iba1 en animales transgénicos PS1xAPP de 6 meses de edad. La microglía residente (A) posee un cuerpo relativamente pequeño y prolongaciones finas, largas y ramificadas. Sin embargo, la microglía activada (B) presenta una morfología diferente, con cuerpos hipertróficos y un destacado acortamiento y engrosamiento de las prolongaciones. Barra de escala: 10 μ m.

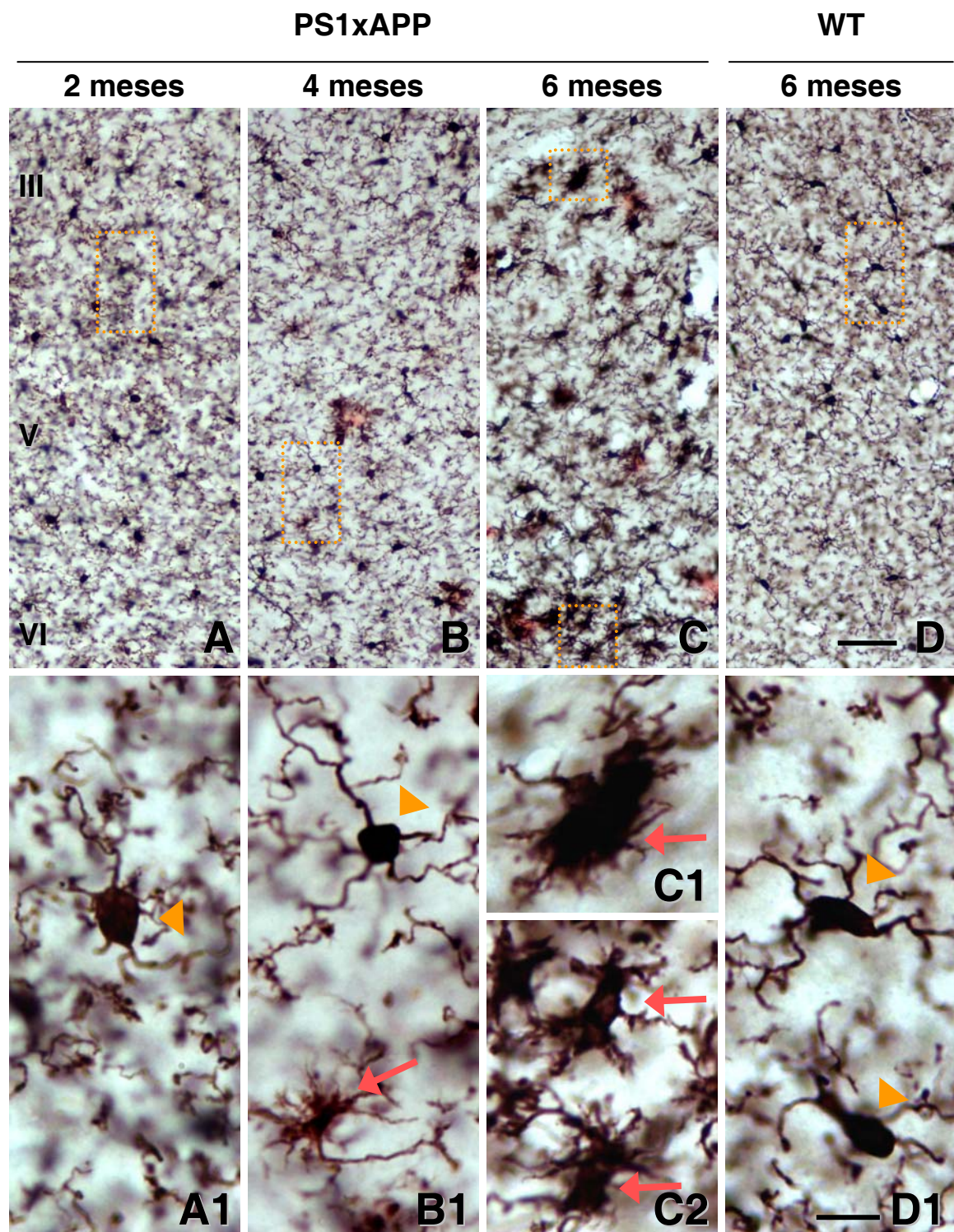


Figura 3.68. Activación de la microglía interplaca en capas profundas de la corteza entorrinal. Inmunohistoquímica con anti-Iba1 contrateñida con rojo congo en animales PS1xAPP (A-C) y WT (D) de 2 (A), 4 (B) y 6 (C y D) meses de edad. Además de la activación de la microglía alrededor de las placas, se observa que, con la edad, las células microgliales interplaca adoptan una morfología muy similar a la activada junto a la placa, con prolongaciones más cortas y gruesas (flechas). El número de microglía activada interplaca es muy notable a los 6 meses de edad. Sin embargo, la microglía residente en los animales WT y en los animales PS1xAPP de 2 meses presenta una morfología no activada, con prolongaciones largas, finas y ramificadas (cabezas de flechas). Barras de escala: 50 μ m (A-D); 10 μ m (A1-D1).

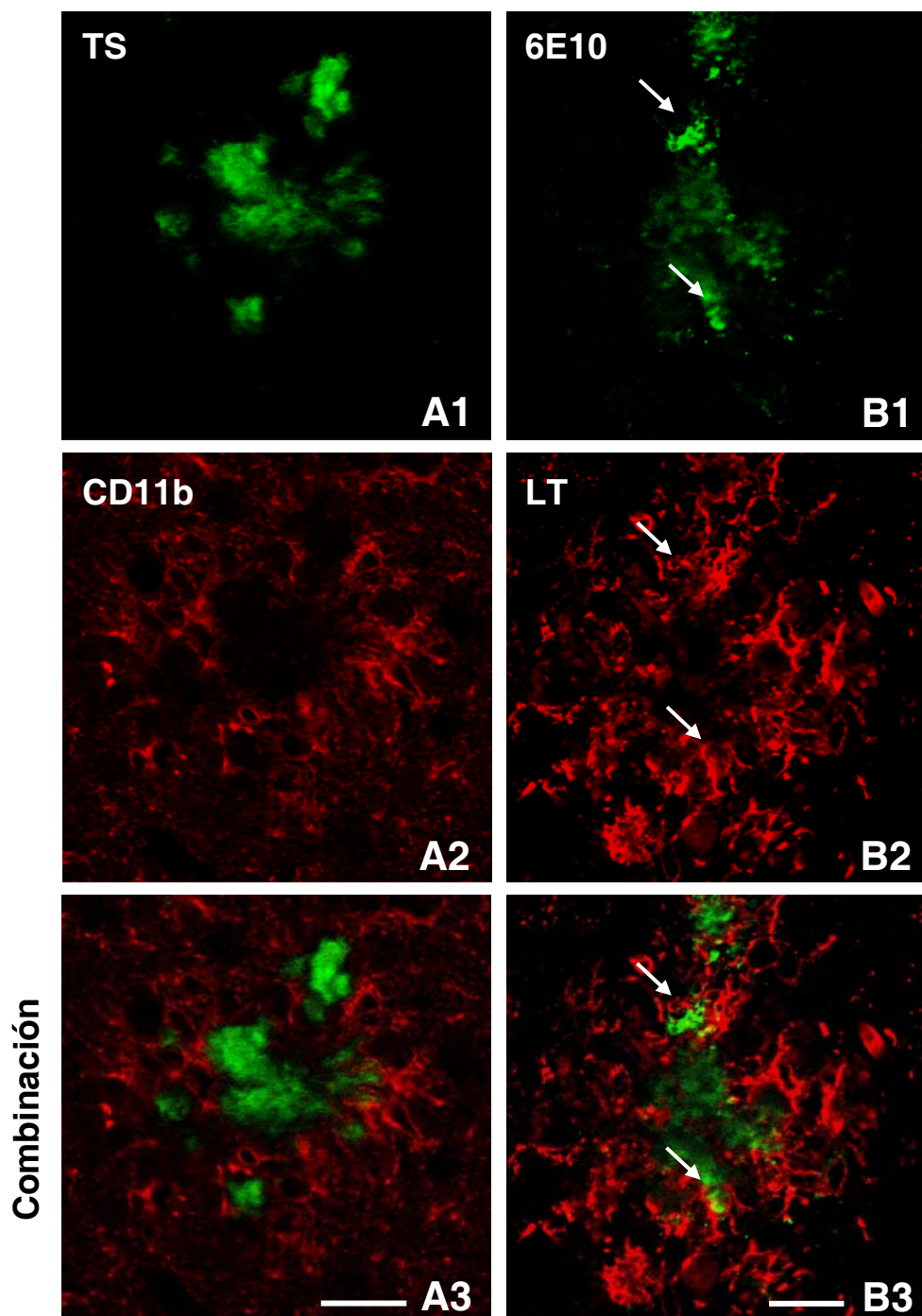


Figura 3.69. Localización de la microglía activada alrededor de las placas amiloides en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 6 meses de edad. Marcaje fluorescente doble para CD11b/Tioflavina S (A1-A3) y Lectina de Tomate/6E10 (B1-B3) a microscopía confocal. En la serie A, se muestra la disposición de la microglía activada (CD11b-positiva) alrededor de los depósitos extracelulares fibrilares marcados con Tioflavina S (TS). De igual forma, en la serie B, se pueden apreciar las células microgliales, marcadas con lectina de tomate (LT), alrededor de placas amiloides (6E10-positivas). Barras de escala: 20 μ m.

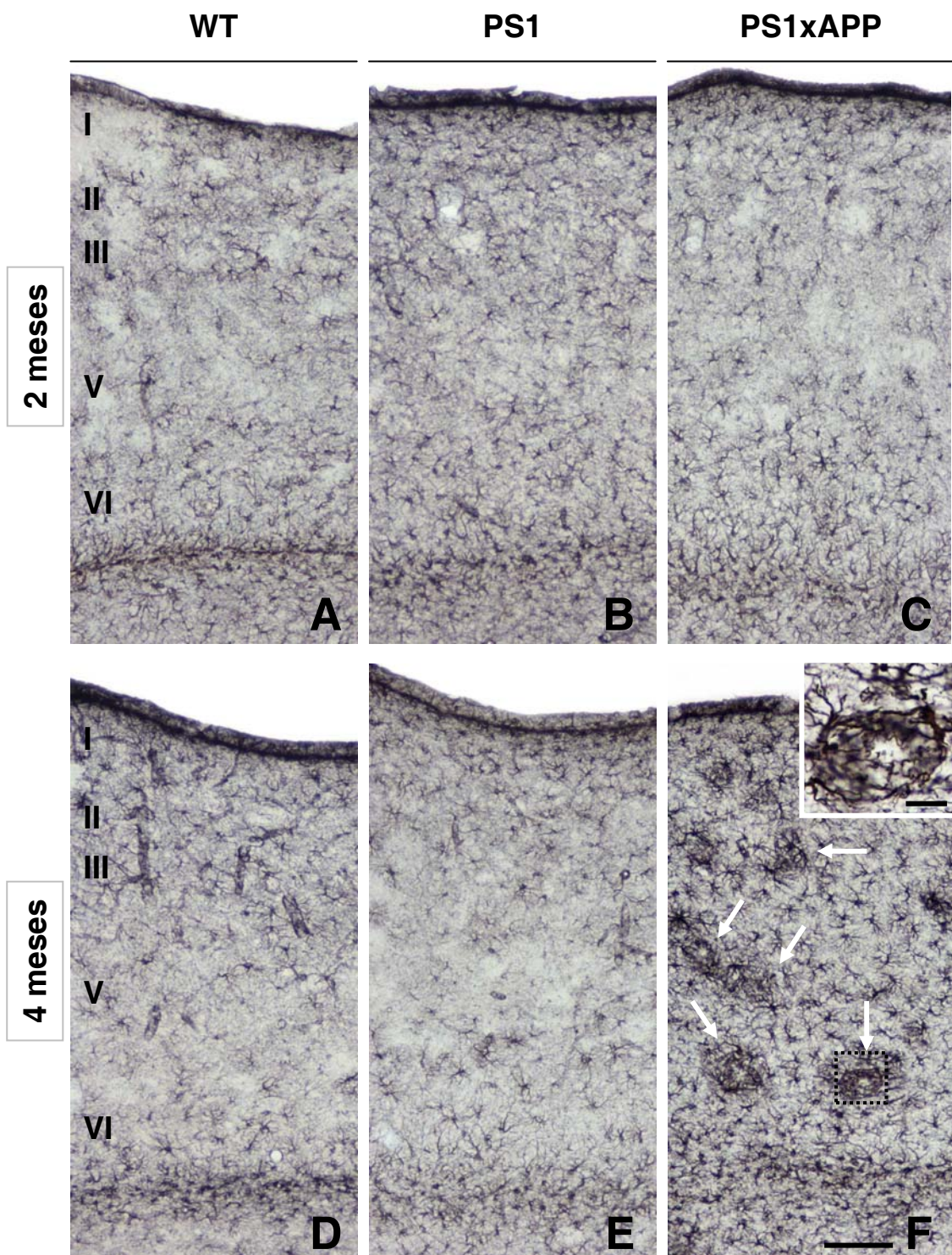


Figura 3.70. Patrón temporal de astrogliosis en la corteza entorrinal. Inmunohistoquímica para GFAP en animales WT (A y D), PS1 (B y E) y PS1xAPP (C y F) de 2 (A-C) y 4 (D-F) meses de edad. A los 2 meses de edad, no se aprecian diferencias en la distribución, densidad ni morfología de los astrocitos corticales entre los distintos genotipos (A-C). A los 4 meses (D-F), los animales PS1xAPP presentan numerosas células astrogliales reactivas en toda la columna cortical y alrededor de las placas amiloides (flechas). En el inserto en F se puede apreciar una placa rodeada de astrocitos reactivos. Barras de escala: 100 μ m (A-F); inserto: 20 μ m.

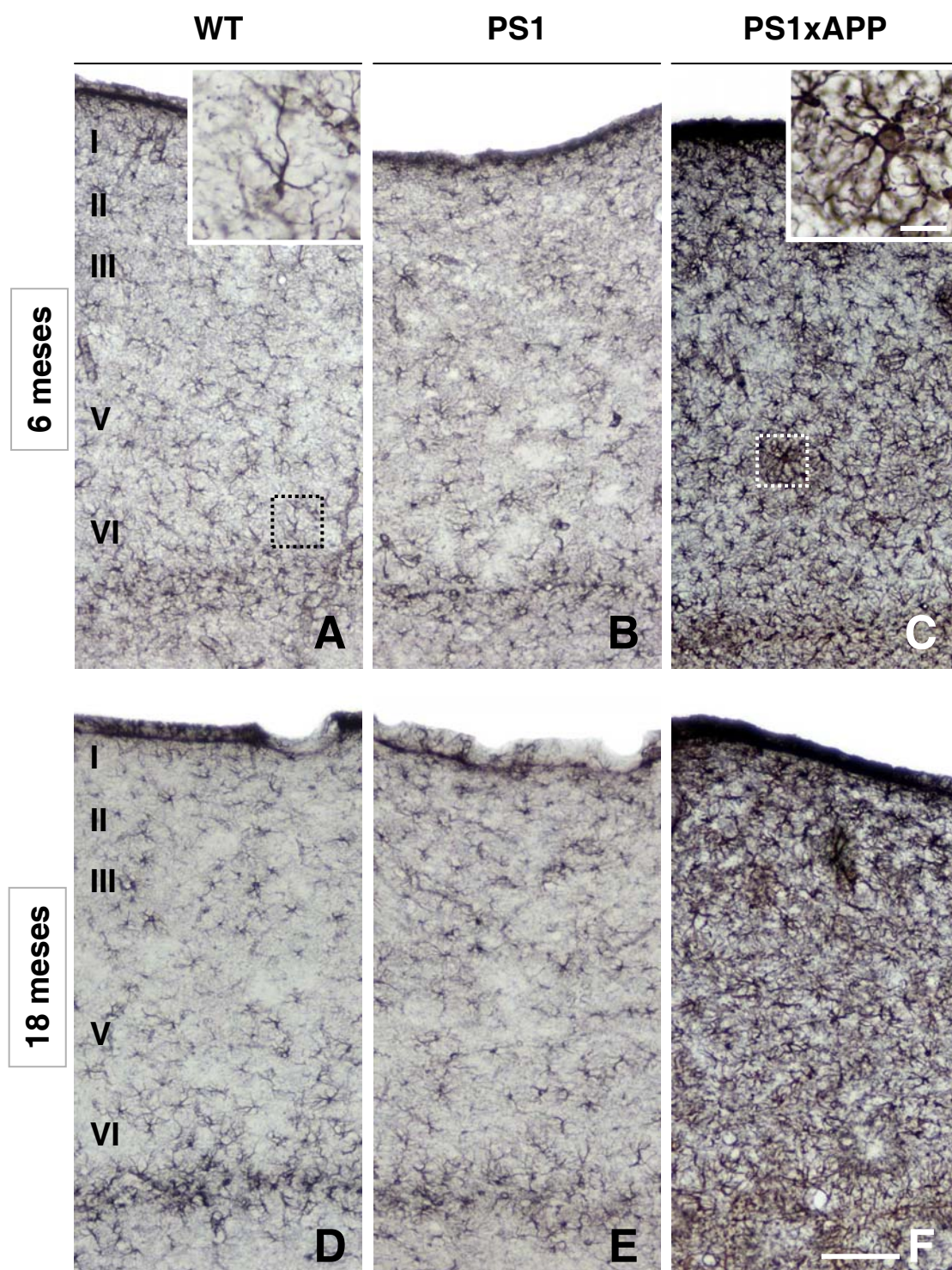


Figura 3.71. Patrón temporal de astrogliosis en la corteza entorrinal. Inmunohistoquímica para GFAP en animales WT (A y D), PS1 (B y E) y PS1xAPP (C y F) de 6 (A-C) y 18 (D-F) meses de edad. A 6 y 18 meses, los animales doble transgénicos presentan una intensa inmunorreactividad para el marcador astrogliar GFAP a lo largo de toda la columna cortical en comparación con los controles WT y PS1. Los astrocitos reactivos de PS1xAPP presentan un fenotipo hipertrófico, con prolongaciones engrosadas (ver inserto en C), en comparación con los animales PS1 y WT (ver inserto en A) de la misma edad. Barras de escala: 100 μ m (A-F); insertos: 20 μ m.

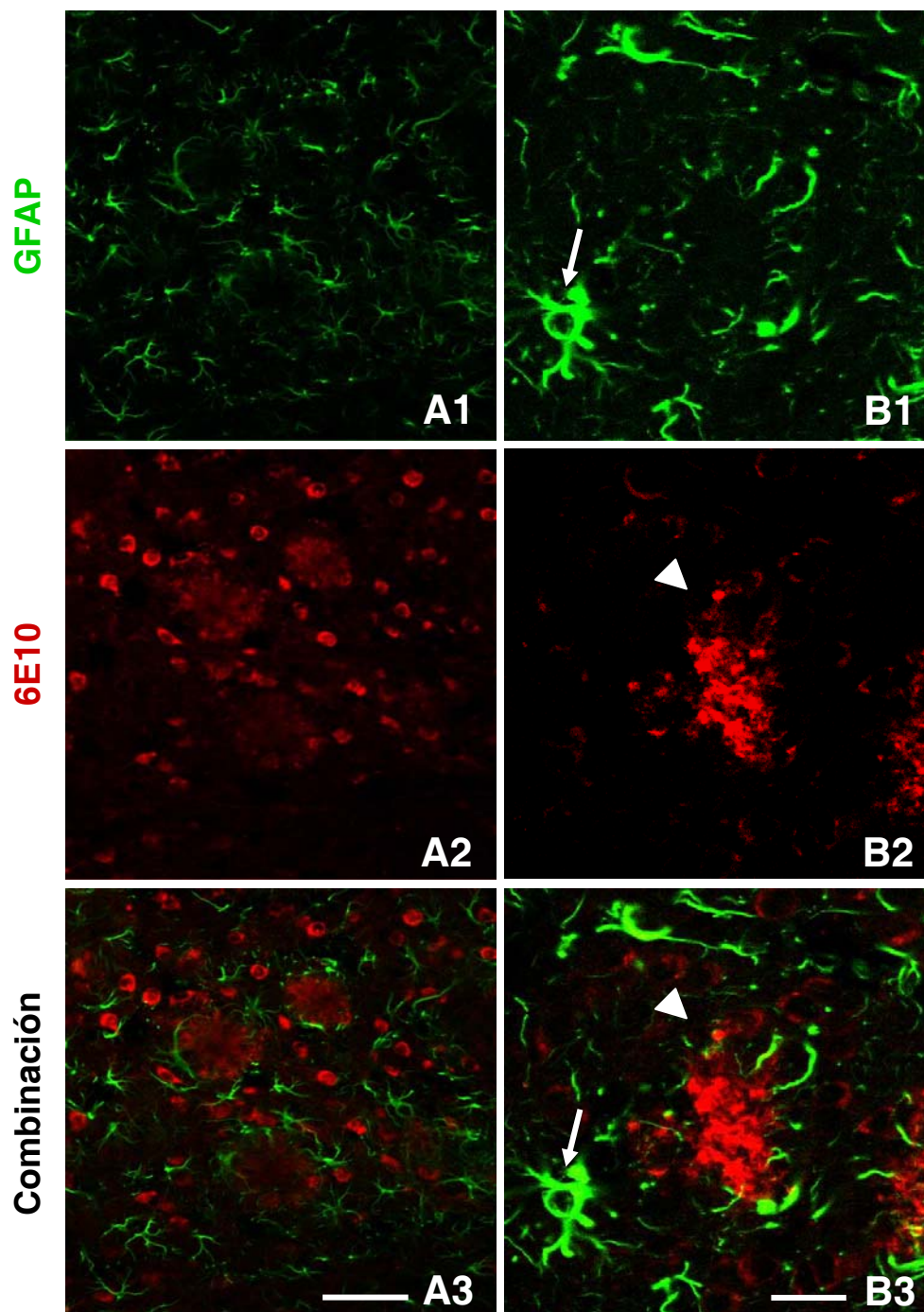


Figura 3.72. Astrocitos reactivos en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 6 meses de edad. Inmunofluorescencia doble para GFAP/6E10 a microscopía confocal. Las células astrogiales reactivas (GFAP-positivas) se localizan alrededor de las placas de amiloide (6E10-positivas), como se muestra en la serie A para las capas profundas de la corteza entorrinal. A mayores aumentos (serie B), se aprecian los astrocitos con aspecto hipertrófico (flecha) y con prolongaciones rodeando e infiltrándose en las placas marcadas con 6E10 (cabeza de flecha). Barras de escala: 50µm (A); 20µm (B).

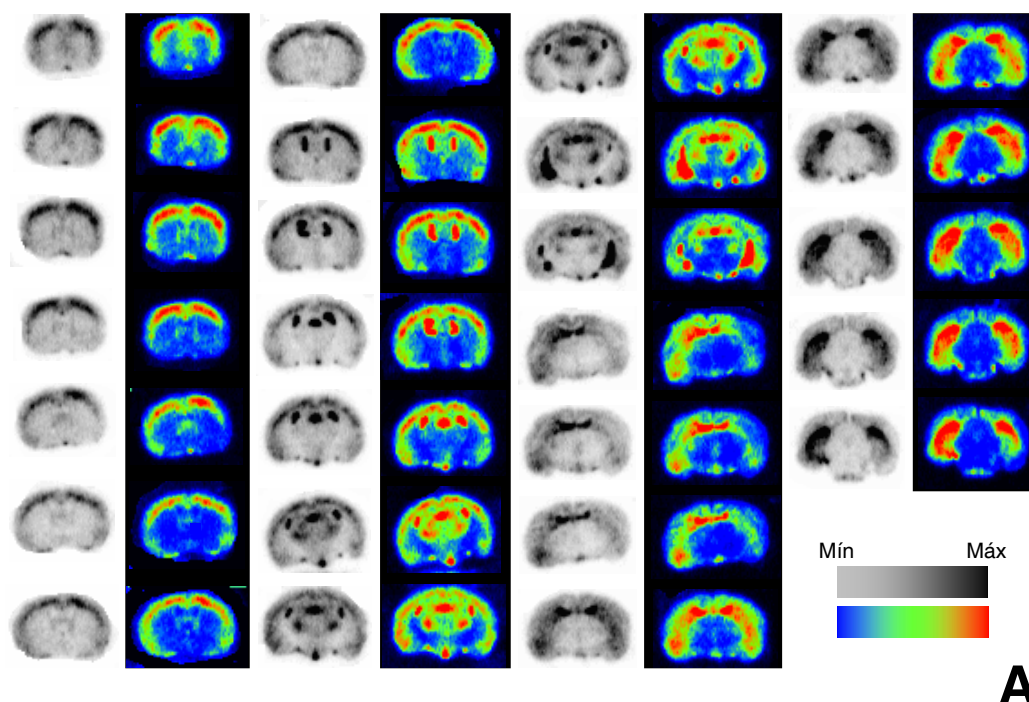
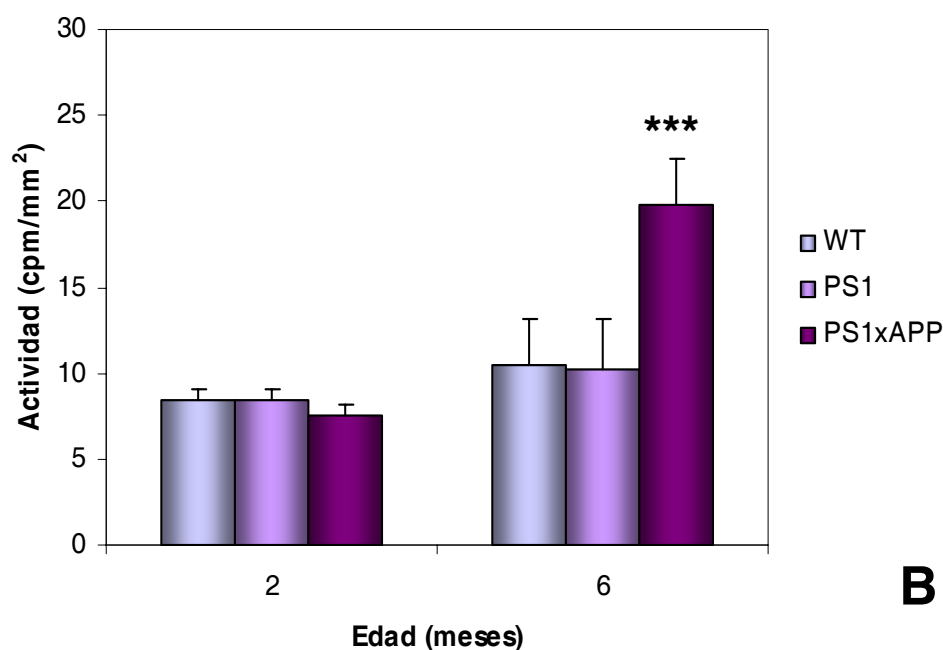
**A****B**

Figura 3.73. Activación glial en la corteza cerebral a edades tempranas. Estudio autorradiográfico con el radioligando ^3H -PK11195 (PBRs) en animales WT, PS1 y PS1xAPP a 2 y 6 meses de edad. El marcaje autorradiográfico para este ligando (marcador de microglía activada) aumenta de forma específica en la corteza cerebral del modelo PS1xAPP, tal y como se puede observar en los autorradiogramas de secciones coronales en el eje rostro-caudal de animales de 6 meses (A). La cuantificación del marcaje autorradiográfico en corteza cerebral muestra un aumento significativo ($189,56 \pm 25,28\%$; Tukey $p < 0,001$) en animales PS1xAPP de 6 meses en comparación con los controles WT y PS1 de la misma edad (B). A los 2 meses de edad no se observan cambios significativos entre los genotipos. ADEVA de una vía, $F(5, 29) = 27,12$, $p < 0,001$; $n = 6$; *** $p < 0,001$.

3.3.2. Existe un incremento temprano en la expresión de factores pro-inflamatorios citotóxicos y receptores de muerte en los animales PS1xAPP

El siguiente paso fue analizar la naturaleza de esta activación glial y para ello se estudiaron mediante RT-PCR los niveles de ARNm para diversos factores citotóxicos, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y otros factores relacionados. A nivel molecular, la cuantificación de la expresión del ARNm del TNF α en muestras microdiseccionadas de corteza entorrinal (Fig. 3.74 A) evidenció un incremento significativo a los 4 meses de edad ($309,73 \pm 116,72\%$, Tukey $p < 0,05$) así como a los 6 meses de edad ($571,07 \pm 309,06\%$; Tukey $p < 0,05$) en los animales PS1xAPP en comparación con los controles. TNF α , además de intervenir en el proceso inflamatorio al incrementar la síntesis de prostaglandinas, entre otras acciones, interviene en el proceso de apoptosis al unirse a su receptor TNFR1, que posee un dominio de muerte, por lo que también se analizaron los niveles de ARNm del receptor TNFR1 (Fig. 3.74 B). La cuantificación mediante RT-PCR mostró un incremento significativo en los animales PS1xAPP a los 4 meses del $237,57 \pm 78,37\%$ (Tukey $p < 0,05$; $n=4$) y a los 6 meses de edad del $243,56 \pm 68,35\%$ (Tukey $p < 0,05$; $n=4$), en comparación con los animales control WT y PS1 de la misma edad.

TNF α no es el único ligando de unión de receptores de muerte, por lo que pasamos a estudiar otros ligandos y receptores implicados en la vía extrínseca de la apoptosis, como son el Ligando Fas (FasL) y su receptor Fas y el ligando TRAIL (ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF α) y uno de sus receptores DR5 (ó TRAIL-R2) mediante RT-PCR en muestras de corteza entorrinal a 4 y 6 meses de edad (Fig. 3.74 C). Los niveles de expresión del ARNm para el receptor Fas en los animales PS1xAPP se vieron incrementados desde los 4 meses de edad en la corteza entorrinal (3 de los 4 individuos analizados), aunque no fue hasta los 6 meses cuando este incremento fue estadísticamente significativo respecto a los controles (Tukey $p < 0,01$; $n=4$), existiendo incluso un animal que expresaba casi 6 veces más Fas que los controles. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en su ligando FasL ni siquiera a los 6 meses de edad. De hecho, a los 4 meses sus niveles fueron indetectables. Por otro lado, los niveles del ARNm para el receptor DR5 no mostraron cambios significativos a los 4 meses, aunque a los 6 meses los niveles de expresión de incrementaron en 4 de los 4 animales PS1xAPP estudiados, sin llegar a ser significativo. Por el contrario, su ligando TRAIL mostró un incremento significativo a los 4 meses de edad del $194,11 \pm 32,50\%$ (Tukey $p < 0,05$; $n=4$) en los animales doble transgénicos, que se mantuvo a los 6 meses, con un valor del $265,78 \pm 70,70\%$ (Tukey $p < 0,01$) respecto a los controles.

Para determinar el origen celular del TNF α , realizamos un estudio inmunohistoquímico empleando un anticuerpo específico para esta citoquina (Fig. 3.75 A-D). Como puede observarse en las imágenes para microscopía convencional, no se encontró inmunorreactividad en los animales WT en ninguna de las edades estudiadas, sin embargo, en los animales PS1xAPP apareció un marcaje difuso pero intenso en toda la corteza entorrinal a los 6 meses de edad. Las imágenes de detalle ponen de manifiesto que las células que expresaban TNF α no presentaban morfología neuronal, sino que tenían aspecto

de células microgliales. Un hecho interesante fue que la periferia de placas amiloides, donde se localizan células microgliales activadas, aparecía inmunonegativa para TNF α . Por lo tanto, la inmunorreactividad para TNF α estaba asociada a la microglía activada interplaca (citotóxica), mientras que la microglía asociada a las placas poseía un fenotipo no citotóxico TNF α -negativo. La inmunotinción de fondo para TNF α en todas las capas corticales podría deberse a la difusión del TNF α soluble. La inmunohistoquímica para el receptor TNFR1 realizada (Fig. 3.75 E-H) mostró que en la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP a los 6 meses de edad existía una mayor inmunorreactividad que en los controles WT a lo largo de toda la columna cortical a nivel del neuropilo. En los doble transgénicos las placas aparecían inmunonegativas.

Además del TNF α , analizamos la expresión del ARNm de enzimas implicadas en la respuesta inflamatoria, como son la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS), la ciclooxygenasa 2 (COX-2) y la NADPH oxidasa 1 (NOX-1), que podrían tener un papel relevante en el proceso inflamatorio que se produce en los animales PS1xAPP a edades tempranas. Los resultados de este estudio cuantitativo se muestran en la Fig. 3.76 A. A los 4 meses de edad, los niveles para iNOS no eran significativamente diferentes entre los animales PS1xAPP y los controles. Sin embargo, a los 6 meses, se producía un incremento estadísticamente significativo para iNOS del $247,81 \pm 122,48\%$ (Tukey $p < 0,05$; $n=4$) en la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP en comparación con los animales control. Como puede apreciarse en el histograma, los niveles de COX2 (Fig. 3.76 B) no mostraron cambios a los 4 meses de edad en los animales PS1xAPP en comparación con los controles analizados. A los 6 meses, existe un incremento en los niveles de la enzima, aunque no llega a ser significativo (aumenta en 3 de los 4 animales analizados). Por otro lado, los niveles de NOX1 no se veían afectados a 4 ni a 6 meses de edad en la corteza entorrinal de los transgénicos PS1xAPP, aunque esto no determina que no lo fueran a edades avanzadas o no se vean afectados otros factores que participan en el estrés oxidativo.

A continuación, quisimos conocer qué tipo o tipos celulares expresaban iNOS en la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP. El estudio inmunohistoquímico (Fig. 3.77) mostró que apenas existe marcaje para iNOS en los animales WT desde los 2 a los 18 meses de edad del animal, a diferencia de los que ocurría en los animales PS1xAPP, en los que ya se detectó a partir de los 4 meses de edad la existencia de inmunorreactividad. Las células que expresaban iNOS poseían una morfología glial, aparentemente astrogliar. A edades tempranas, las células iNOS-positivas se localizaban preferentemente en las capas profundas corticales y, gradualmente, se extendían hacia capas superficiales. Con la edad, este marcaje se hace más denso y fue a los 12 y 18 meses cuando toda la columna cortical se encontraba cubierta por células iNOS-positivas, a excepción de las zonas de depósitos extracelulares, que eran inmunonegativas. Los experimentos de doble marcaje fluorescente iNOS/GFAP (Fig. 3.78) demostraron que todas las células iNOS-positivas expresaban GFAP y, por lo tanto, eran astrocitos.

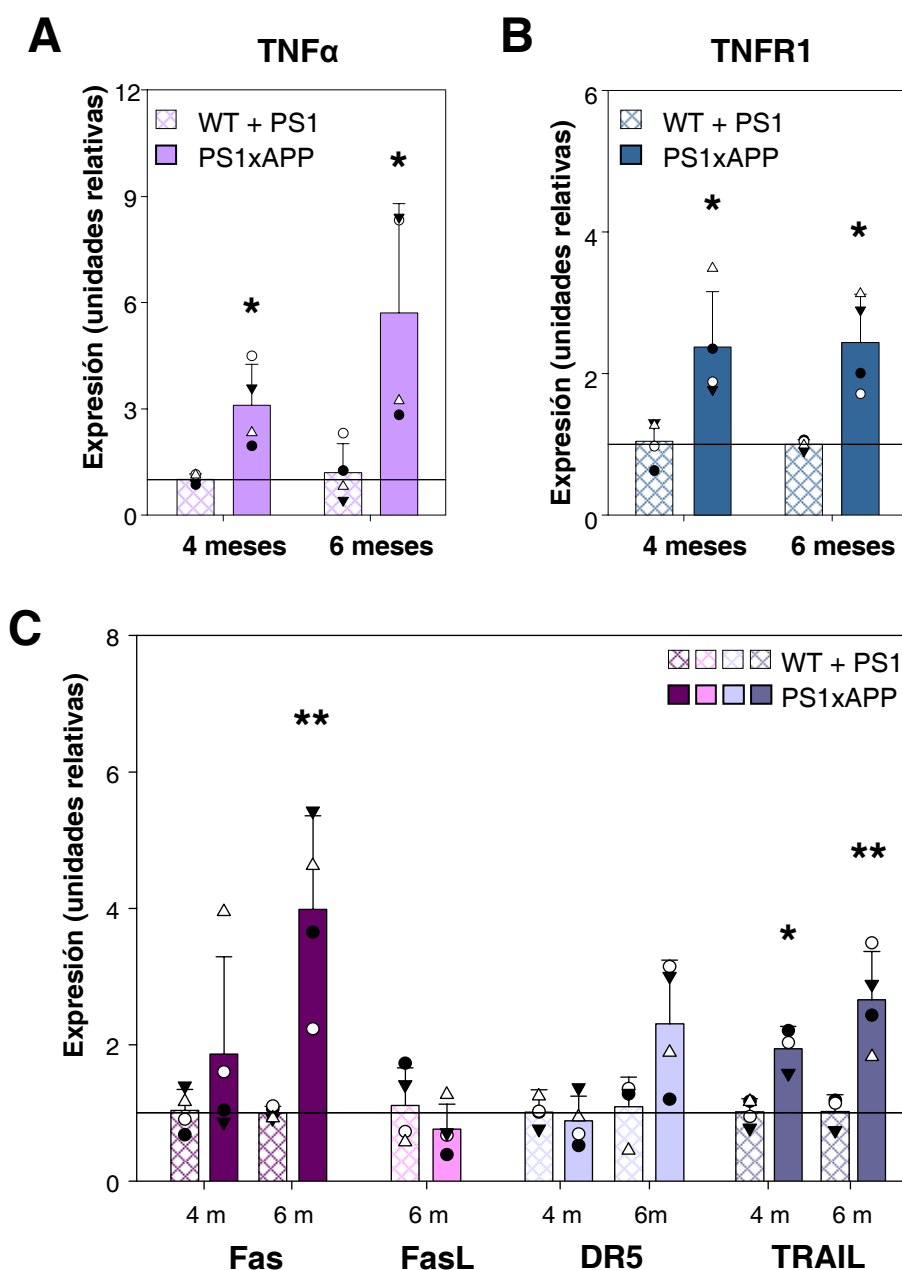


Figura 3.74. Cuantificación de los niveles de ARNm para TNF α y factores relacionados, así como sus correspondientes receptores, en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP a edades tempranas. Estudio mediante RT-PCR en muestras microdisseccionadas por láser. **A)** Existe un incremento significativo (ADEVA de una vía, $F(3, 12)=6,58$, $p=0,007$) de la expresión de TNF α tanto a 4 ($309,73\pm116,72\%$, Tukey $p<0,05$) como a 6 ($571,07\pm309,06\%$, Tukey $p<0,05$) meses de edad en comparación con los controles. **B)** En el caso de TNFR1, también se observa un incremento significativo (ADEVA de una vía, $F(3, 12)=8,67$, $p=0,002$) a los 4 meses ($237,57\pm78,37\%$, Tukey $p<0,05$) en los animales PS1xAPP comparado con los controles. Este aumento se mantiene a los 6 meses ($243,56\pm68,35\%$, Tukey $p<0,05$). **C)** Se observa un aumento significativo (ADEVA de una vía, $F(3, 12)=8,13$, $p=0,003$) en la expresión del receptor Fas a 6 meses de edad ($398,23\pm137,26\%$, Tukey $p<0,01$), aunque no de su ligando FasL, en los animales PS1xAPP. Sin embargo, para el ligando TRAIL, existe un aumento significativo (ADEVA de una vía, $F(3, 10)=12,23$, $p<0,001$) tanto a 4 ($194,11\pm32,50\%$, Tukey $p<0,05$) como a 6 meses ($+265,78\pm70,70\%$, Tukey $p<0,01$), pero no para su receptor DR5 (ADEVA de una vía, $F(3, 12)=2,07$, $p=0,16$). $n=4$; * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

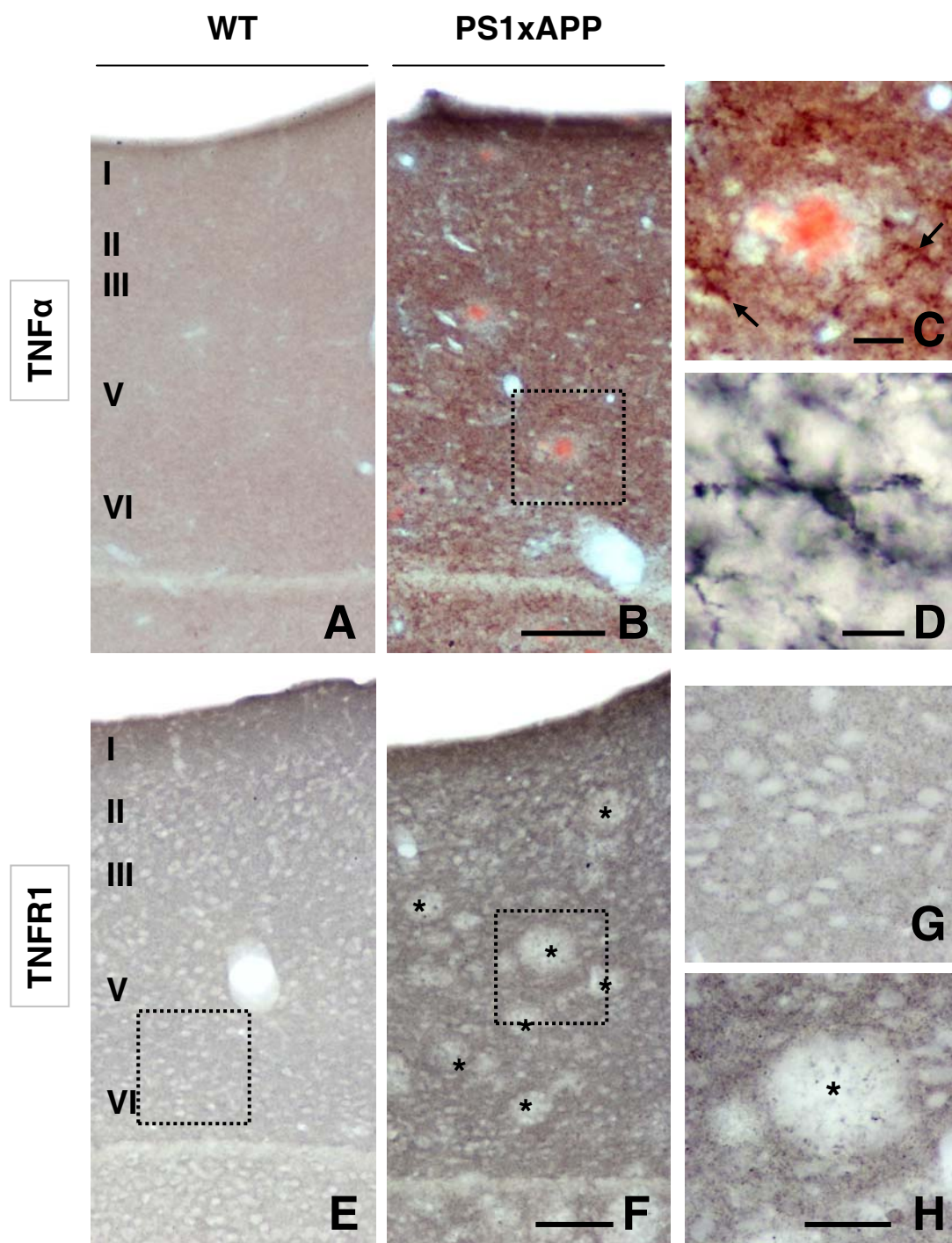


Figura 3.75. Expresión de $\text{TNF}\alpha$ (A-D) y su receptor TNFR1 (E-H) en corteza entorrinal. Estudio inmunohistoquímico en animales WT (A, E y G) y PS1xAPP (B-D, F y H) de 6 meses de edad. La inmunorreactividad para $\text{TNF}\alpha$ es muy intensa en los animales PS1xAPP en comparación con los WT. La inmunotinción se localiza difusa en el neuropilo y en células de aspecto microglial (flechas en C y célula a mayores aumentos en D). La periferia de las placas amiloides (rojo congo positivas) es inmunonegativa para $\text{TNF}\alpha$ (ver B y el recuadro a mayores aumentos en C). La inmunorreactividad para TNFR1 se localiza en el neuropilo y es mucho más intensa en los doble transgénicos que en los controles. Los asteriscos en F y H señalan placas amiloides inmunonegativas para TNFR1 . En G y H se muestran imágenes a mayores aumentos de los recuadros en E y F, respectivamente. Barras de escala: 100 μm (A, B, E y F); 50 μm (C, G y H); 10 μm (D).

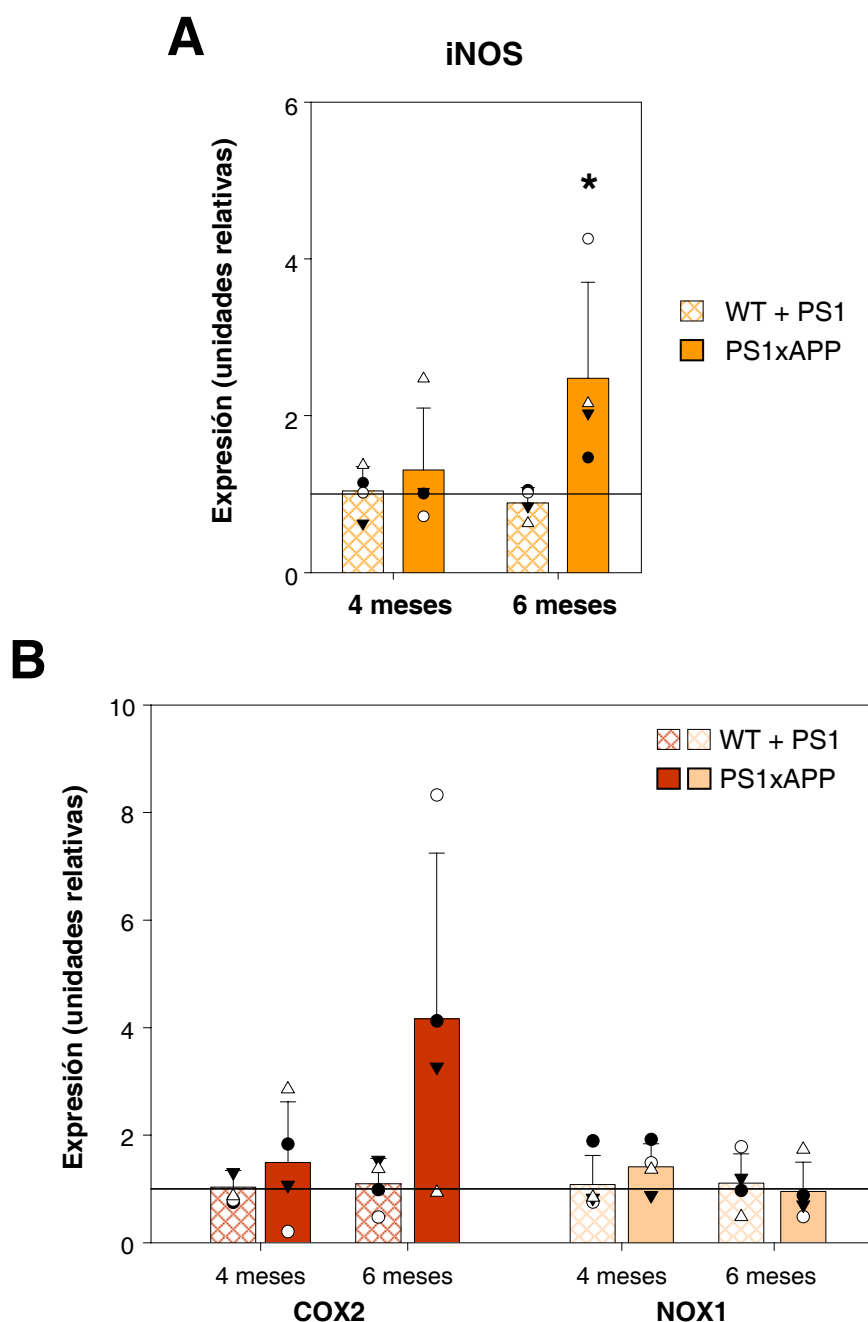


Figura 3.76. Cuantificación del ARNm de enzimas implicadas en la respuesta inflamatoria iNOS (A), COX2 y NOX1 (B). Estudio en corteza entorrinal a edades tempranas. El estudio mediante RT-PCR en muestras microdisseccionadas por láser revela un aumento significativo (ADEVA de una vía, $F(3, 12)=3,60$, $p<0,05$) a los 6 meses de edad del ARNm para iNOS ($247,81\pm122,48\%$; Tukey $p<0,05$) en los animales PS1xAPP comparado con el grupo control de su misma edad. La expresión del ARNm de enzimas como la COX2 (ADEVA de una vía, $F(3, 12)=3,21$, $p>0,05$) y NOX1 (ADEVA de una vía, $F(3, 12)=0,57$, $p>0,05$) no varía de forma significativa entre los animales control y los doble transgénicos a las dos edades analizadas (4 y 6 meses), aunque los niveles de COX2 están elevados en 3 de los 4 animales estudiados a 6 meses ($p=0,062$). $n=4$; * $p<0,05$.

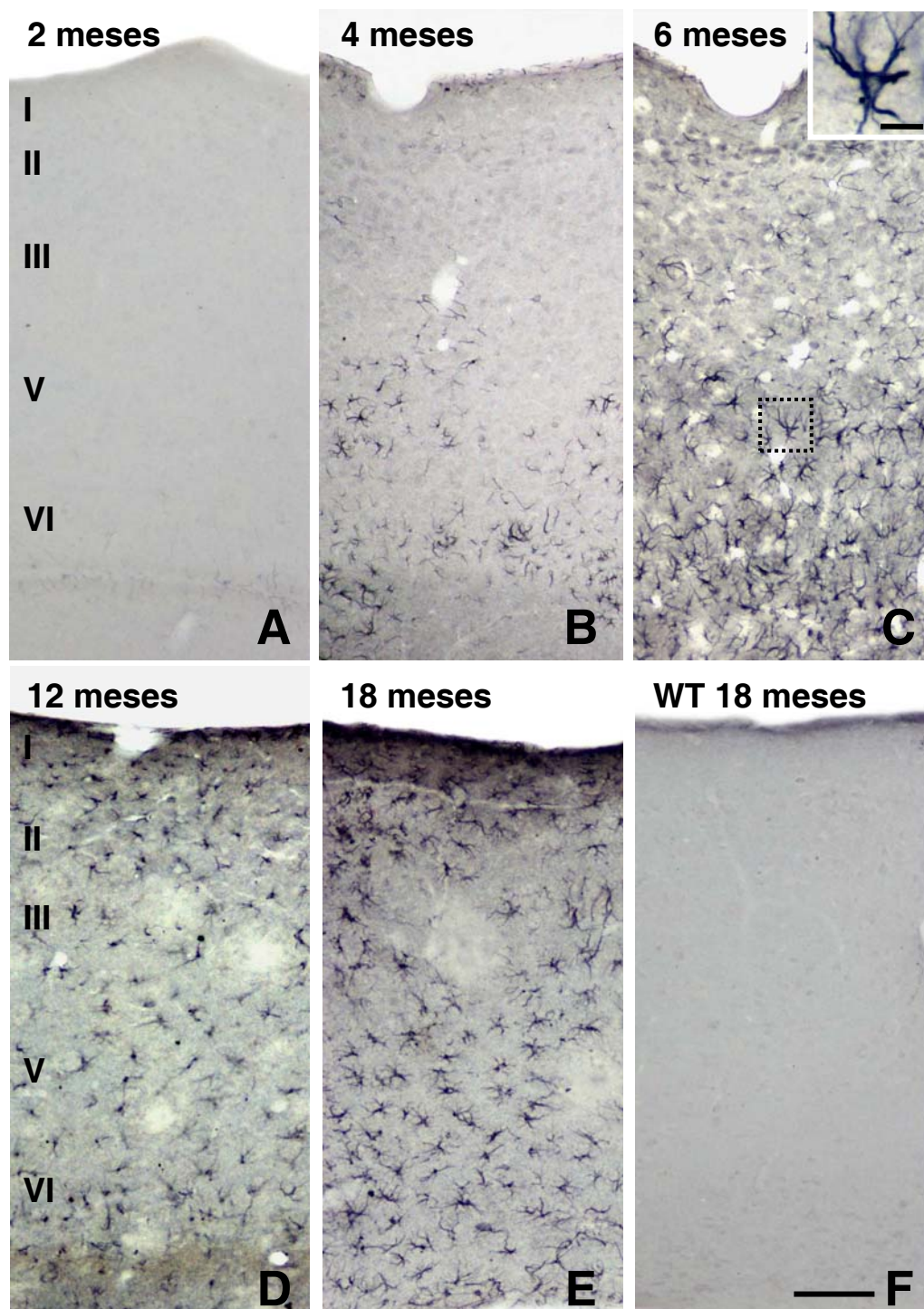


Figura 3.77. Patrón de expresión temporal de iNOS en la corteza entorrinal. Estudio inmunohistoquímico en animales PS1xAPP (A-E) y WT (F) de 2 (A), 4 (B), 6 (C), 12 (D) y 18 (E y F) meses de edad. A los 2 meses de edad no se detecta inmunorreactividad destacada para iNOS en animales PS1xAPP. Sin embargo, a los 4 y 6 meses se observan células de aspecto astroglial inmunoteñidas que se localizan preferentemente en las capas profundas. A los 12 y 18 meses, aumentan el número de células inmunorreactivas y se localizan por toda la columna cortical. El inserto en C muestran a mayor detalle una célula iNOS-positivas con aspecto de astroglial. El animal WT no muestra inmunotinción para iNOS (F). Barras de escala: 100 μ m (A-F); inserto: 20 μ m.

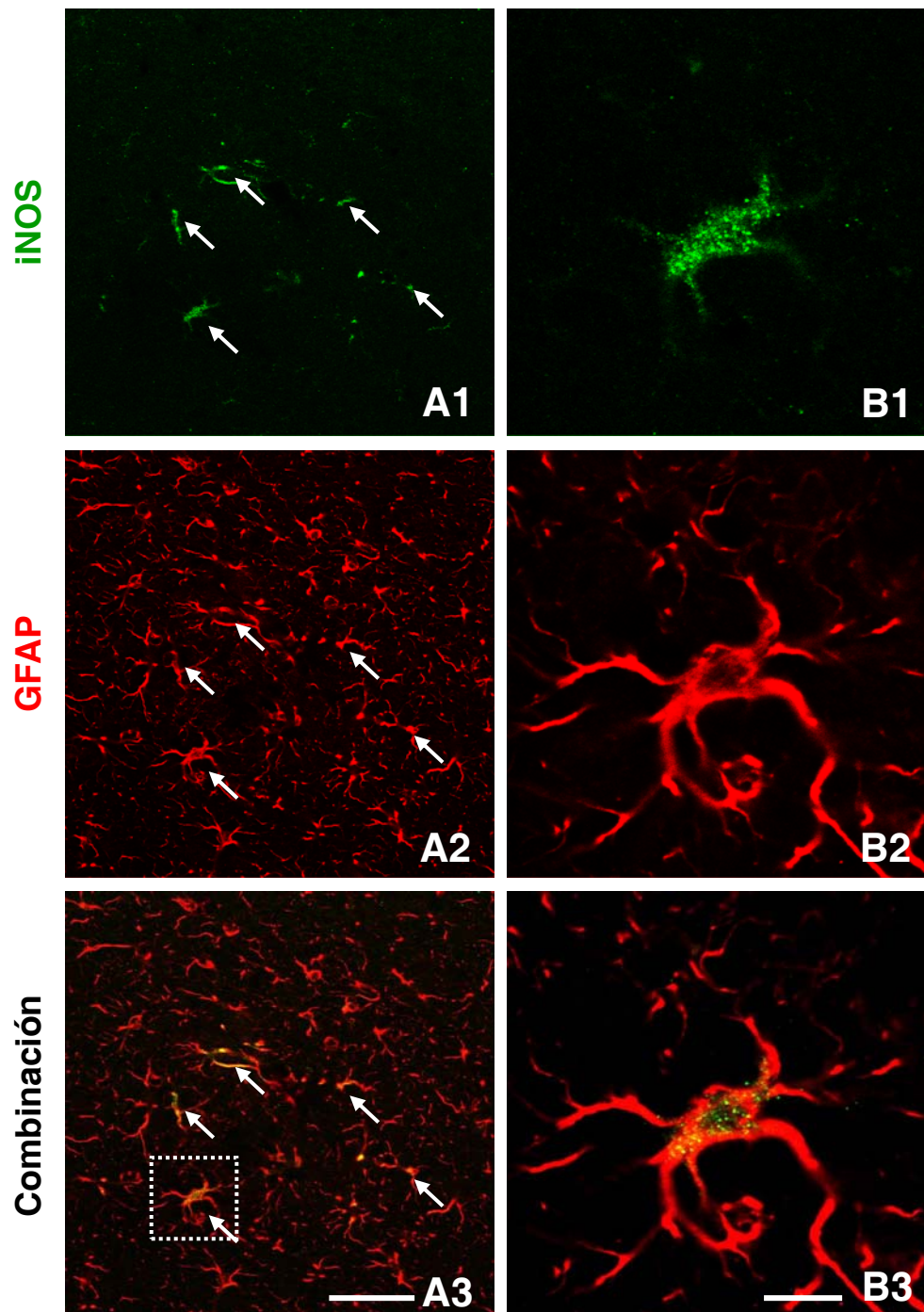


Figura 3.78. La expresión de iNOS se localiza en los astrocitos en la corteza entorrinal. Inmunofluorescencia doble iNOS/GFAP a microscopía confocal en animales PS1xAPP de 6 meses de edad. En estas imágenes se observa el marcaje de iNOS (en verde, A1 y B1) y de la astrogliá con GFAP (en rojo, A2 y B2), así como su colocalización (en amarillo, A3 y B3). Estas imágenes demuestran que la enzima sintasa de óxido nítrico inducible se expresa en células astrogliales (flechas en la serie A y detalle de la célula en el recuadro de A3 en la serie B). Barras de escala: 50 μ m (A); 10 μ m (B).

3.3.3. La microglía activada que rodea estrechamente a las placas presenta un fenotipo alternativo

Las células microgliales, al igual que los macrófagos periféricos, pueden ser activadas mediante las denominadas vía clásica y vía alternativa. La vía clásica es inducida por citoquinas inflamatorias del tipo interferón gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral alfa. La microglía así activada (M1) produce óxido nítrico y TNF α , entre otros. La vía alternativa es inducida por citoquinas tipo Th2 anti-inflamatorias, como la IL-4 e IL-13. Esta microglía alternativa (M2) no produce NO y se diferencia por expresar Ym1, FIZZ, arginasa y tener mayor capacidad fagocítica. Coloquialmente, se habla de una microglía “buena” o anti-inflamatoria y una microglía “mala” o pro-inflamatoria.

En nuestros resultados anteriores, hemos demostrado que la microglía activada interplaca es potencialmente citotóxica al ser TNF α -positiva, sin embargo, la microglía activada localizada alrededor de las placas es inmunonegativa para este factor y, por lo tanto, podría tener un fenotipo alternativo.

En primer lugar, analizamos la existencia de microglía alternativa a edades tempranas (6 meses) y tardías (18 meses), empleando el anticuerpo anti-Ym1 (Fig. 3.79 A-C). A los 6 meses de edad, los animales WT no presentaban inmunomarcaje a lo largo de la corteza entorrinal, mientras que en los individuos PS1xAPP aparecían estructuras punteadas inmunorreactivas alrededor de depósitos de A β , principalmente en las capas profundas de la corteza entorrinal. Aunque mayoritariamente la marca positiva para Ym1 poseía un aspecto granulado, se podían encontrar células de morfología microglial completamente teñidas (Fig. 3.79 B1). A los 18 meses, el patrón de expresión fue similar. Eso sí, al aumentar el número y tamaño de las placas amiloideas, también aumentó el marcaje con Ym1, aunque el número de estructuras inmunorreactivas alrededor de cada placa parecía disminuir. En los animales control WT y PS1 (no mostrados) seguía sin existir marca específica alguna. Para comprobar si las células marcadas con Ym1 eran, efectivamente, células microgliales como pensábamos, se realizó una inmunohistoquímica doble para microscopía de fluorescencia empleando el anticuerpo Ym1 y el marcador lectina de tomate para la microglía en general. Efectivamente, como se muestra en la Fig. 3.79 D, la inmunorreactividad para Ym1 se localizaba en células microgliales localizadas alrededor de los depósitos extracelulares

Como se ha comentado anteriormente, la microglía activada con fenotipo alternativo posee una mayor actividad fagocítica, por lo que decidimos analizar este aspecto. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal empleando los marcadores 6E10 (amiloide total) y lectina de tomate (microglía) mostraron zonas de co-localización para ambos marcadores (Fig. 3.80).

Por lo tanto, a edades tempranas existe microglía activada en la corteza entorrinal y hemos podido determinar la existencia de dos poblaciones diferentes, una con fenotipo alternativo (no citotóxico), localizada alrededor de las placas, y otra población con fenotipo citotóxico (TNF α positiva) en las regiones interplaca. Esto, junto con la presencia de

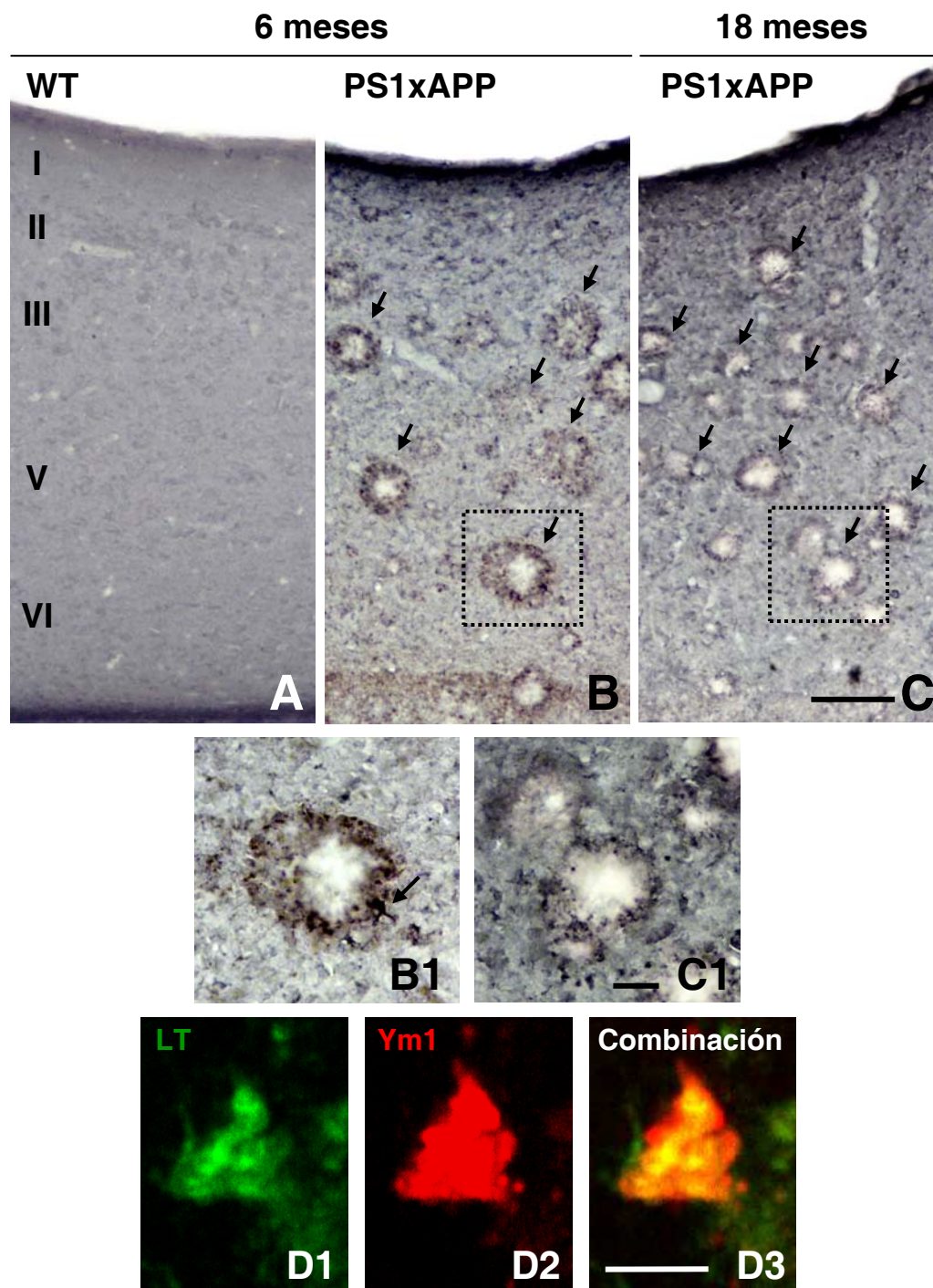


Figura 3.79. Fenotipo alternativo de la microglía activada que rodea las placas. A-C) Inmunohistoquímica para Ym1 en la corteza entorrinal de animales WT (A) y PS1xAPP (B y C) de 6 (A y B) y 18 (C) meses de edad. La inmunorreactividad para Ym1 se localiza alrededor de las placas de amiloide en los animales PS1xAPP desde los 6 meses de edad (B y B1). Esta expresión se mantiene a los 18 meses (C y C1). Los animales WT no presentan inmunotinción (A). Barras de escala: 100 μ m (A-C); 25 μ m (B1 y C1). D) Marcaje fluorescente doble Ym1/Lectina de tomate para microscopía confocal en animales PS1xAPP de 6 meses de edad. Colocalización de Ym1 en células microgliales marcadas con lectina de tomate (LT). Barra de escala: 20 μ m (D).

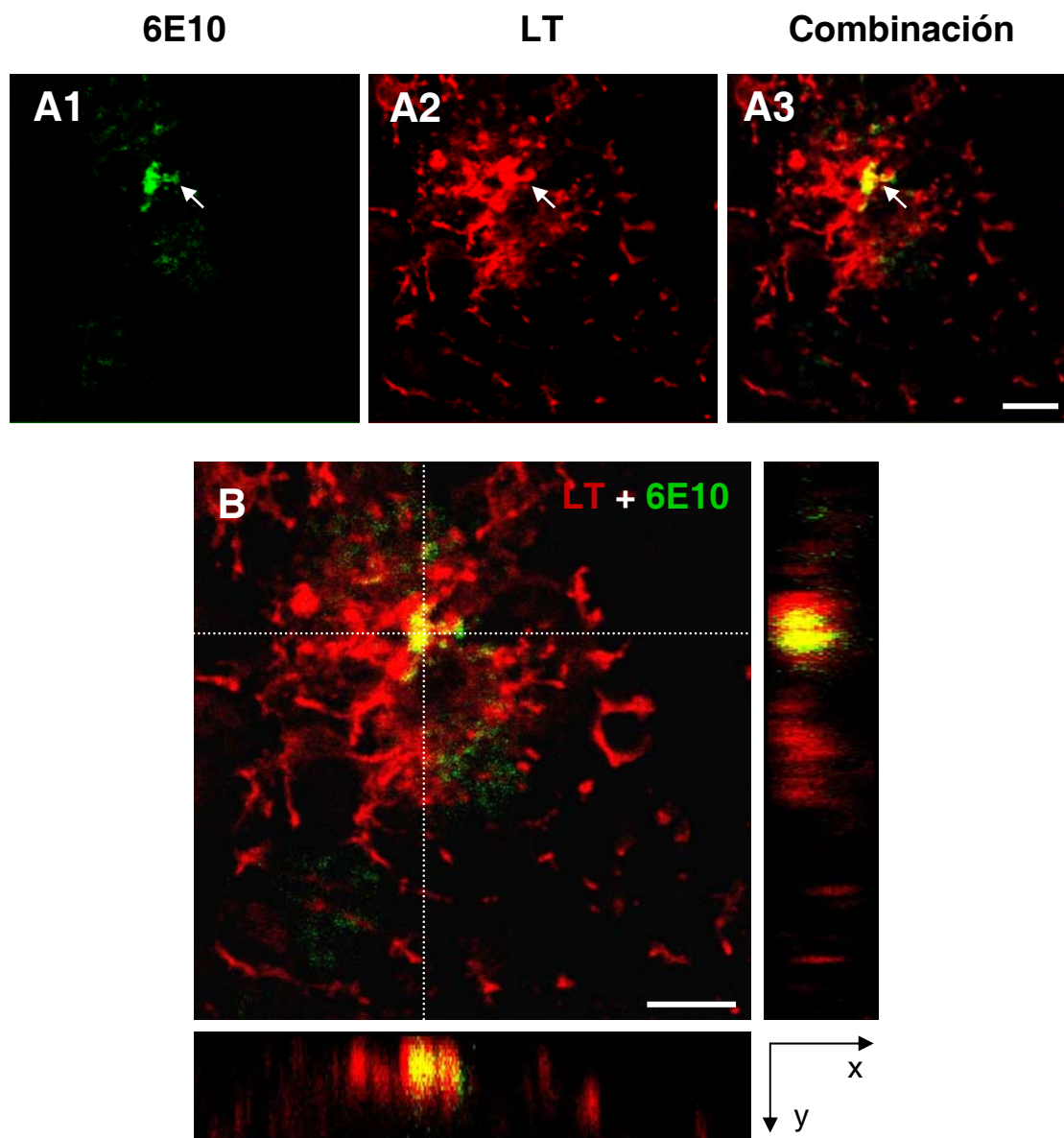


Figura 3.80. Actividad fagocítica de la microglía activada asociada a placas. Marcaje fluorescente doble para Lectina de tomate y 6E10 en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 6 meses de edad. En la serie A, se observa amiloide extracelular marcado con 6E10 (en verde) rodeado de células microgliales marcadas con lectina de tomate (en rojo). En las imágenes de reconstrucción en pseudo-3D (B) de la serie A, puede observarse que las células microgliales contienen intracelularmente amiloide, seguramente como consecuencia de procesos de fagocitosis. Barras de escala: 10 μ m.

astrocitos reactivos que expresan iNOS, sugiere que el proceso inflamatorio es potencialmente citotóxico a estas edades y podría contribuir al proceso neurodegenerativo.

3.3.4. El factor neurotrófico IGF1 es expresado por la microglía activada asociada a las placas amiloides

La microglía alternativa con características anti-inflamatorias, además de tener capacidad fagocítica, podría estar asociada a la producción de factores pro-supervivencia y/o neurotróficos. Resultados previos del grupo en el hipocampo, indicaban que el factor neurotrófico que se induce en este modelo es el IGF1, por lo que decidimos centrarnos en su estudio. Mientras que en los animales control apenas era detectable la expresión del anticuerpo IGF1 a 2 y 6 meses de edad, como puede observarse en la Fig. 3.81, en los animales transgénicos se obtuvo una elevada expresión entre los 4 (no mostrado) y los 6 meses de edad. El marcaje de IGF1 parecía concentrarse alrededor de las placas amiloides congófilicas y presentaba un aspecto granulado o punteado. El estudio de la expresión del ARNm de IGF1 mediante RT-PCR confirmó que existía un aumento significativo del $443,98 \pm 194,03\%$ (Tukey $p < 0,01$; $n=4$) a los 6 meses en los animales PS1xAPP en comparación con los animales control.

Para conocer qué tipo celular producía IGF1, realizamos dobles tinciones para microscopía confocal empleando marcadores para células astrogiales y microgliales en animales PS1xAPP de 6 meses de edad. Cuando se analizó el doble marcaje para microglía (con LT) e IGF1 (Fig. 3.82), se observó que, aun siendo la marca muy débil para IGF1, existía co-localización. Al realizar una reconstrucción pseudos-3D se corroboró la doble co-localización entre ambos marcadores. Se podría tratar entonces de microglía activada por la vía alternativa capaz de producir factores pro-supervivencia. La inmunohistoquímica fluorescente para GFAP (astroglía) e IGF-1 (no mostrada) reveló que no coincidían.

Dado que el marcaje de IGF1 no solapaba al cien por cien con la microglía, decidimos ver qué otros tipos celulares podrían estar expresando este factor. De este modo pudimos comprobar que las neuritas distróficas SOM-positivas contenían IGF1 (Fig. 3.83).

Además de la distribución de IGF1, era importante conocer la expresión de su receptor, denominado IGF1R (IGF1 receptor tipo I). Para ello, realizamos un estudio inmunohistoquímico empleando un anticuerpo contra IGF1R e IGF1R fosforilado (IGF1RP) en animales control WT y PS1xAPP a 6 meses de edad (Fig. 3.84). Los individuos PS1xAPP presentaban una inmunotinción de aspecto punteado alrededor de las placas de A β con el anticuerpo contra la forma fosforilada del receptor de IGF1 que no aparecía en los animales control (Fig. 3.84 A). El anticuerpo contra la forma no fosforilada mostró un marcaje glial alrededor de las placas amiloides (Fig. 3.84 B), así como en núcleos neuronales (Fig. 3.84 C) y en algunos vasos sanguíneos (Fig. 3.84 D). La expresión de IGFR en glía, núcleos neuronales y vasos ha sido descrita por otros autores en animales WT (Burgess y col., 1987; Torres-Aleman, 2007). Sin embargo, en los animales PS1xAPP, el marcaje nuclear era menor que en los WT, mientras que el marcaje glial y endotelial fue más intenso. Un doble marcaje para microscopía fluorescente confocal para IGF1R y GFAP demostró que eran las

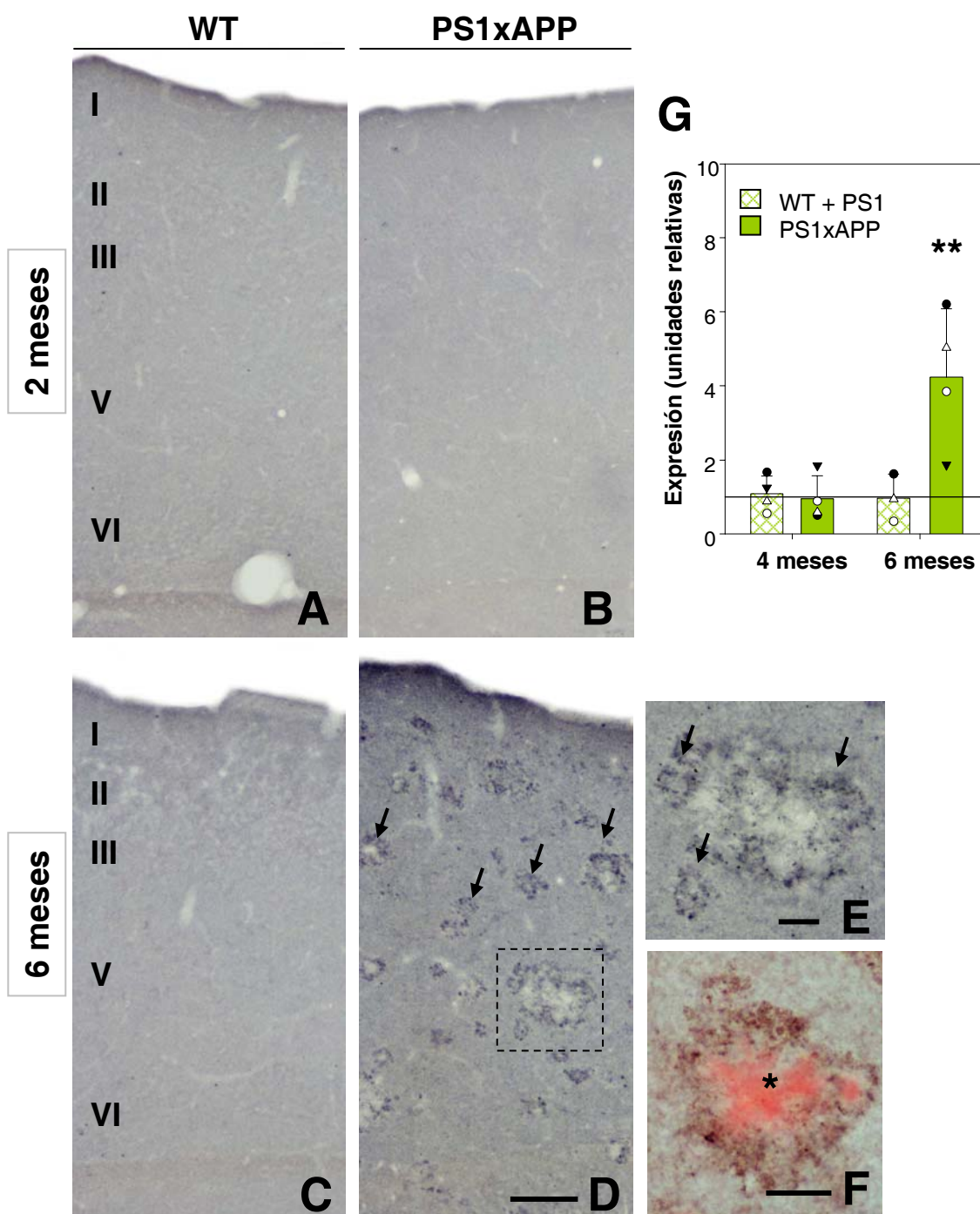


Figura 3.81. Expresión del factor neurotrófico IGF1 en corteza entorrinal a edades tempranas. Inmunohistoquímica para IGF1 en animales WT (A y C) y PS1xAPP (B y D-F) de 2 (A y B) y 6 (C-F) meses de edad. G) Expresión del ARNm para IGF1 a 4 y 6 meses de edad. A los 2 meses de edad, no se observa inmunotinción para IGF1 en animales WT (A) ni PS1xAPP (B). Sin embargo, a los 6 meses, se detecta inmunorreactividad para IGF1 alrededor de las placas amiloides (flechas) en los animales PS1xAPP (D), mientras que los animales WT siguen siendo inmunonegativos (C). El marcaje presenta un aspecto punteado (ver E y F) alrededor de depósitos de amiloide congofílicos (asterisco en F). La cuantificación mediante RT-PCR en muestras microdisecionadas de corteza entorrinal muestra un aumento significativo (ADEVA de una vía, $F(3, 11)=8,72$, $p=0,003$) del ARNm para IGF1 ($443,98 \pm 194,03\%$, Tukey $p<0,01$) en los animales PS1xAPP a los 6 meses de edad comparado con los controles de la misma edad. Barras de escala: 100 μ m (A-D); 25 μ m (E y F). $n=4$ ** $p<0,01$.

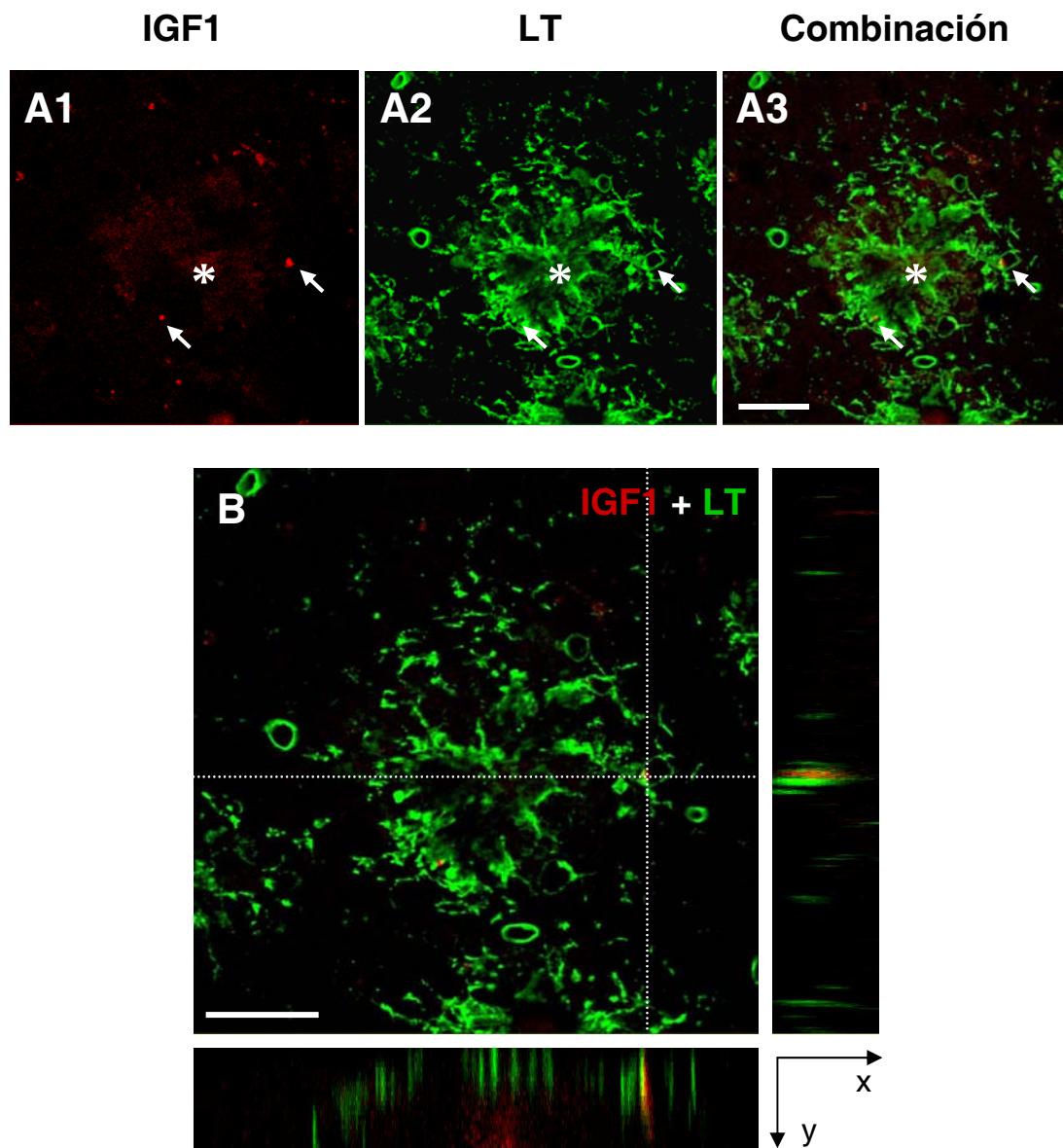


Figura 3.82. Las células microgliales alrededor de las placas expresan IGF1. Doble marcaje fluorescente para IGF1 (rojo) y lectina de tomate (verde) a microscopía confocal en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 6 meses de edad. Las imágenes de la serie A muestran el inmunomarcaje para el factor IGF1 (en rojo, A1) y el marcaje de microglía con lectina de tomate (en verde, A2), así como su colocalización (flechas, A3). El asterisco señala un depósito de amiloide. En la reconstrucción pseudo-3D (B) de las imágenes de la serie A, se observa la presencia de IGF1 en las células de la microglía que rodean al depósito amiloide. Barras de escala: 25 μ m.

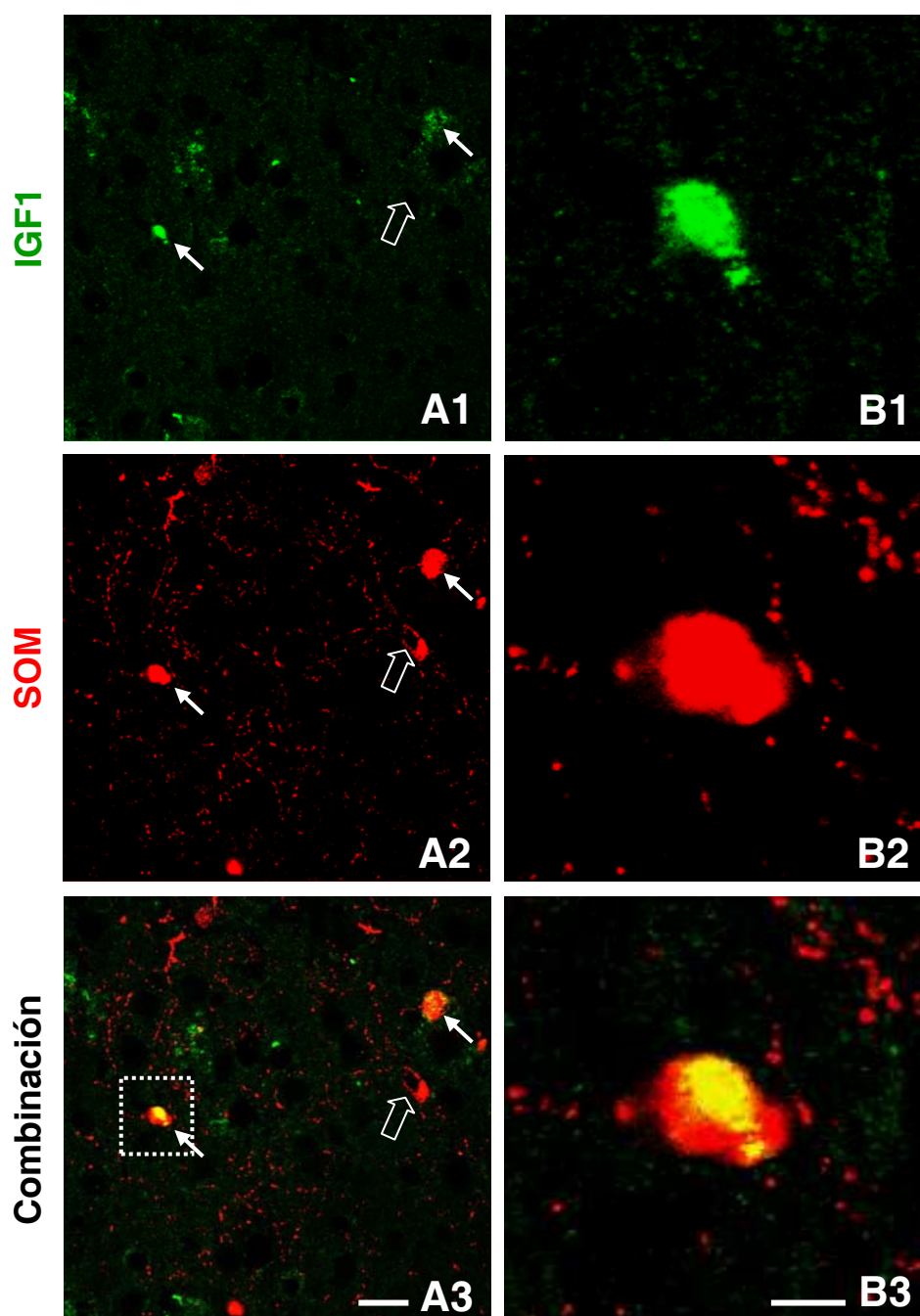


Figura 3.83. El factor neurotrófico IGF1 está presente en neuritas distróficas que contienen SOM en la corteza entorrinal. Inmunofluorescencia doble para IGF1/SOM a microscopía confocal en animales PS1xAPP de 6 meses de edad. El marcaje de IGF1 (en verde, A1 y B1) está presente en neuritas distróficas inmunorreactivas para SOM (en rojo, A2 y B2) como demuestra la imagen combinada (A3 y B3). Algunas neuritas (flechas), pero no todas, aparecen doblemente marcadas. Los somas SOM-positivos no contienen IGF1 (flecha abierta). La serie B muestra a mayores aumentos una neurita distrófica SOM-positiva que contiene IGF1 (encuadrada en A3). Barras de escala: 20 μ m (A); 5 μ m (B).

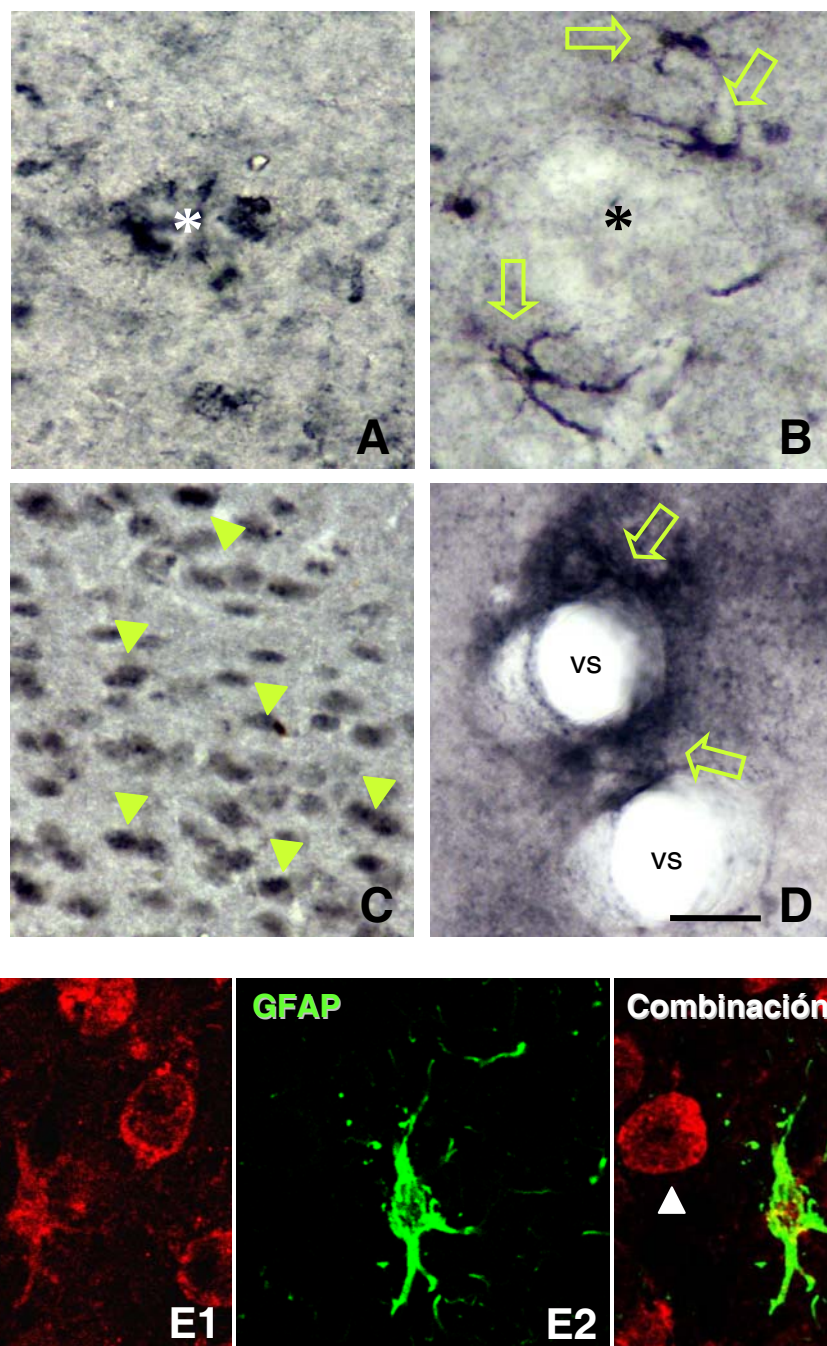


Figura 3.84. El receptor para IGF1 se expresa en núcleos neuronales y en astrocitos en la corteza entorrinal. A-D) Inmunohistoquímica para IGF1R e IGF1RP en animales PS1xAPP a 6 y 18 meses de edad. Con anti-IGF1RP (forma fosforilada) existe marcaje punteado alrededor de las placas (A) a 6 meses. Con anti-IGF1R, a 18 meses, se observa tinción en células de morfología astroglial (flechas abiertas, B) alrededor de placas amiloides (asteriscos), en cuerpos neuronales (cabezas de flecha, C) y alrededor de algunos vasos sanguíneos (vs, D). **E) Inmunofluorescencia doble para IGF1R (rojo) y GFAP (verde) en animales PS1xAPP de 12 meses de edad.** En las imágenes a microscopía confocal se observa que existe colocalización (flecha abierta, E3) del marcaje de IGF1R (en rojo, E1) y de GFAP para astroglía (en verde, E2). Las células astrogliales (flechas) y los núcleos neuronales (cabezas de flecha) son inmunorreactivos para IGF1R. Barras de escala: 25 μ m (A-D); 10 μ m (E).

células astrogliales alrededor de las placas las que expresaban el receptor de IGF1 (Fig. 3.84 E).

3.3.5. Expresión de interleuquina IL4 por astrocitos y linfocitos T en la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP

Hemos visto que el proceso inflamatorio temprano (4-6 meses) que presenta la corteza entorrinal en los animales PS1xAPP presenta microglía activada tanto clásica (citotóxica) como alternativa (neuroprotectora). Sin embargo, la microglía con fenotipo clásico (interplaca) es mucho más abundante que la alternativa (alrededor de las placas). La microglía alternativa, aunque minoritaria, puede ser inducida por IL4 (Stein y col., 1992; Duque y Rojas, 2007), por lo que nuestro siguiente paso fue analizar mediante inmunohistoquímica la presencia de esta interleuquina en la corteza entorrinal de los animales transgénicos PS1xAPP a la edad de 6 meses. Los resultados (Fig. 3.85 A-C) mostraron tinción específica en forma de estructuras punteadas alrededor de las placas amiloides que aparecían principalmente en las capas profundas de la corteza entorrinal. Posteriormente, y según resultados previos en el hipocampo de este modelo (Jimenez y col., 2008), se determinó el origen celular de IL4 en astrocitos y linfocitos T. Para ello, se emplearon dobles marcajes inmunofluorescentes para microscopía confocal, IL-4/CD3 (para linfocitos T) e IL4/GFAP (para astrocitos). En la Figura 3.85 se muestra la colocalización de IL4 en linfocitos T CD3-positivos (Fig. 3.85 D) y en astrocitos reactivos (Fig. 3.85 E). A edades tempranas el número de linfocitos T fue muy escaso, siendo, por lo tanto, los astrocitos la principal fuente de IL4.

La infiltración de linfocitos T en la corteza entorrinal se estudió utilizando un anticuerpo contra la molécula de superficie CD3 en animales WT y PS1xAPP a todas las edades (2, 4, 6, 12 y 18 meses).. Los primeros linfocitos CD3⁺ aparecían a la edad de 6 meses (Fig. 3.86) y su número fue incrementándose a lo largo del envejecimiento, hasta los 18 meses. La localización de estos linfocitos T se observó, principalmente, en las zonas próximas a los depósitos amiloides. Por el contrario, en los animales control WT y PS1 no se encontraron infiltrados de linfocitos T, como se aprecia en la imagen de la corteza entorrinal de un animal WT de 12 meses de edad (Fig. 3.86 D). Todos los linfocitos eran IL4-positivos, por lo que se trataban de linfocitos Th2 anti-inflamatorios, cuya función probablemente era la de limitar la respuesta inflamatoria en la corteza entorrinal de este modelo animal.

3.3.6. Existe disminución de los niveles de fractalquina en la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP

La fractalquina ó CX3C es una quimioquina producida principalmente por las neuronas, encontrándose tanto en membrana como en forma soluble. La fractalquina soluble es un quimioatrayente de las células inflamatorias, capaz de suprimir la actividad citotóxica microglial (Cardona y col., 2006; Re y Przedborsli, 2006). Además, posee efectos neuroprotectores, ya que es capaz de reducir la apoptosis neuronal. Debido a que los

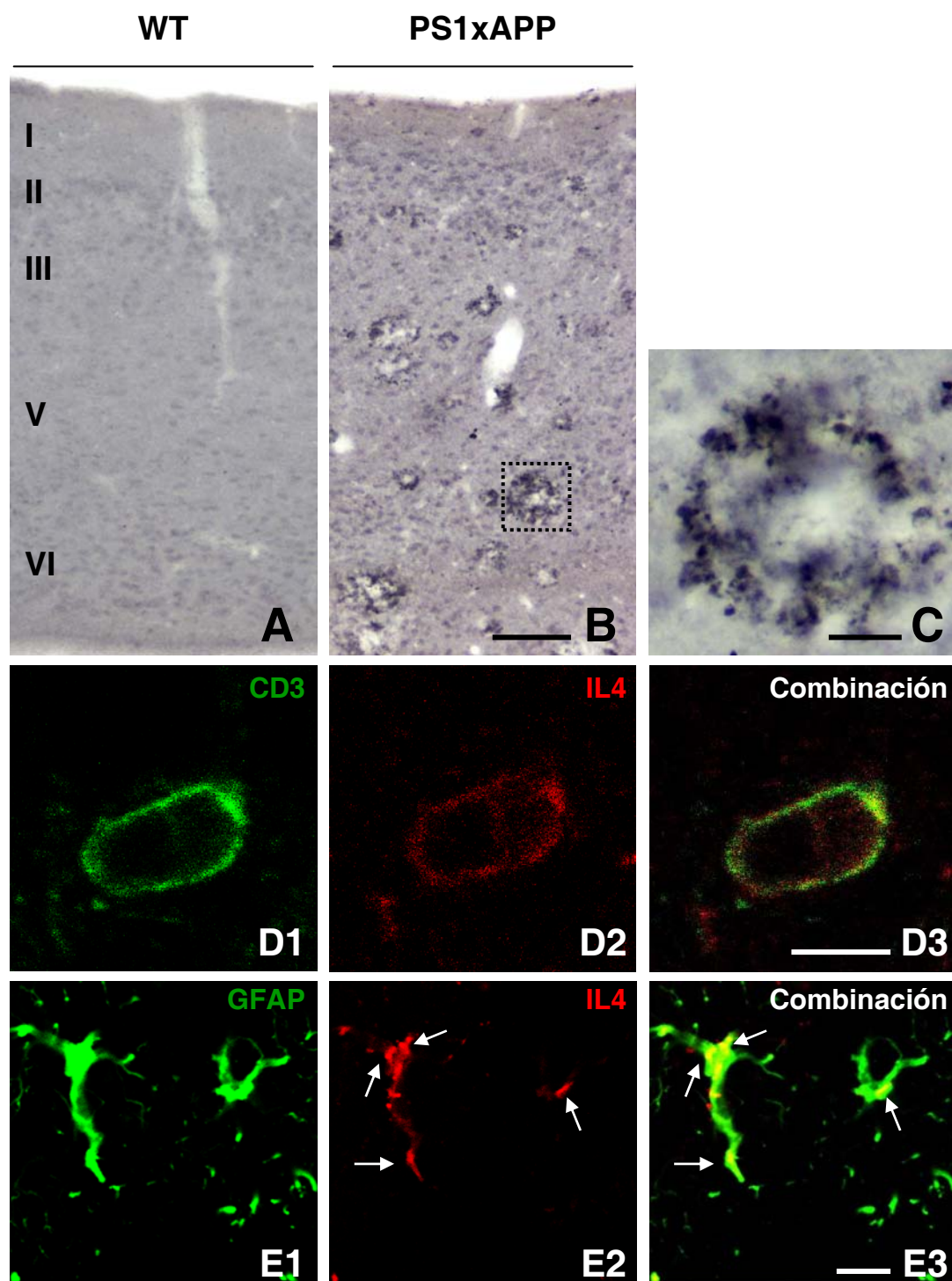


Figura 3.85. Expresión de interleuquina 4 (IL4) en la corteza entorrinal. A-C) Inmunohistoquímica de IL4 en la corteza entorrinal de animales WT (A) y PS1xAPP (B y C) a 6 meses de edad. El marcaje con IL4 aparece íntimamente unido a las placas de amiloide, que permanecen sin teñir, como se muestra en el detalle (C). Sin embargo, este marcaje no aparece en los animales control de la misma edad (A). Barras de escala: 100 μ m (A y B); 20 μ m (C). D-E) Inmunohistoquímica doble para CD3/IL4 y GFAP/IL4 a microscopía confocal en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP de 12 meses de edad. En la serie D, se muestra un linfocito T CD3-positivo que expresa IL4. En la serie E, se muestra marcaje intracelular con IL4 en células astrogiales GFAP-positivas (flechas). Barras de escala: 5 μ m (D1-D3); 10 μ m (E1-E3).

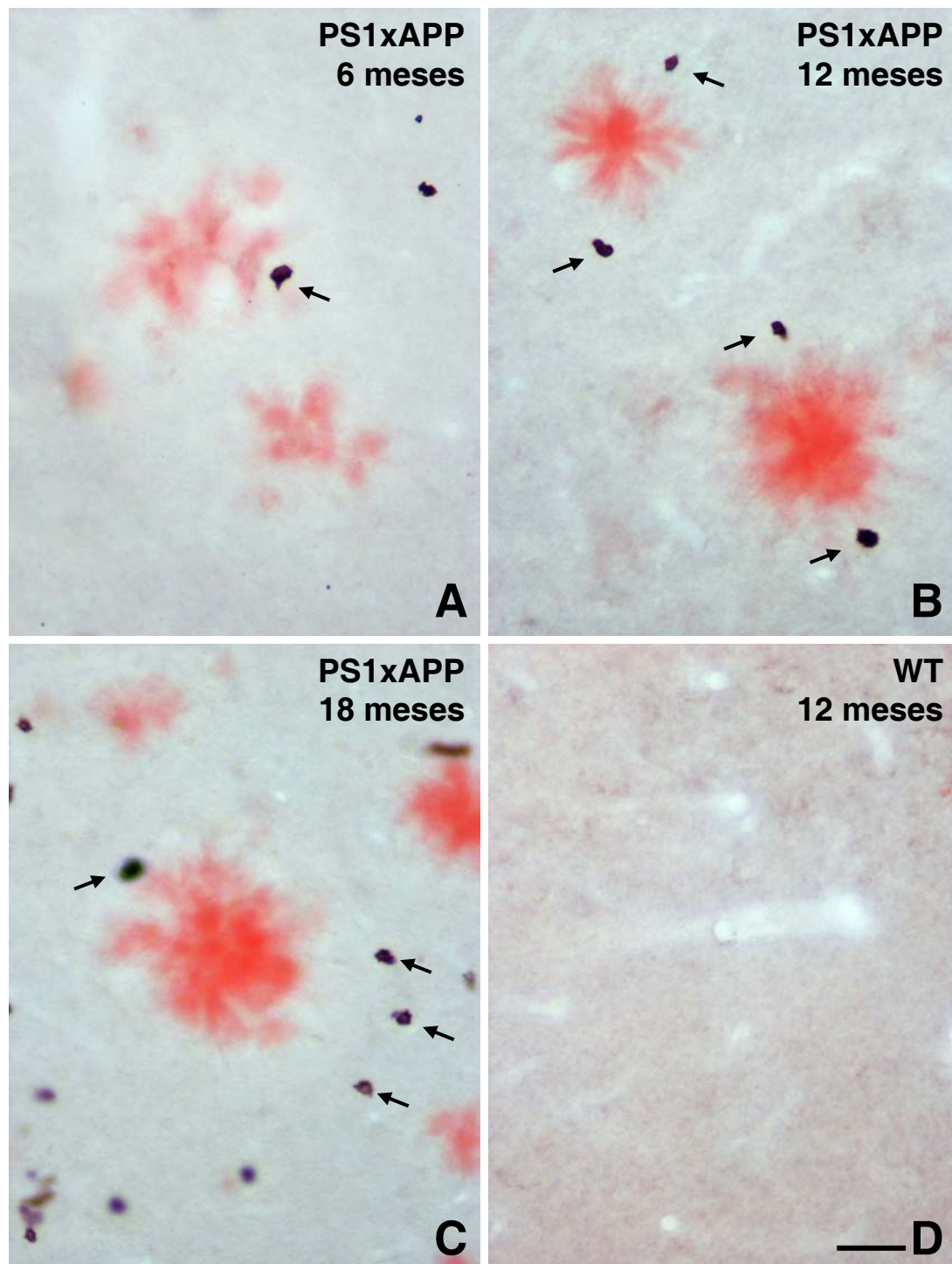


Figura 3.86. Infiltración de linfocitos T en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP. Inmunohistoquímica para CD3 y tinción de rojo congo en animales PS1xAPP (A-C) y WT (D) de 6 (A), 12 (B y D) y 18 (C) meses de edad. El marcador para CD3 muestra la aparición de linfocitos T alrededor de las placas de amiloide, marcadas con rojo congo, en los animales PS1xAPP. El número de linfocitos T CD3-positivos aumenta con la edad, desde los 6 meses (A), hasta los 18 (C), mientras que no se observan en los animales control (D). Barra de escala: 20 μ m.

niveles de fractalquina solubles en plasma están disminuidos en los pacientes con Alzheimer avanzado (Kim y col., 2008) y que existe un desbalance de la activación microglial a favor del fenotipo citotóxico en contra del alternativo, decidimos realizar un estudio previo de los niveles de fractalquina a edades tempranas (4 y 6 meses) mediante RT-PCR en muestras microdiseccionadas con láser de la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP (Fig. 3.87). Los resultados mostraron que los niveles de expresión de fractalquina eran significativamente menores (aproximadamente un 30%) en los animales PS1xAPP (Tukey $p < 0,05$), desde los 4 meses de edad, en comparación con los animales control de la misma edad. Esto podría justificar, al menos en parte, la existencia de abundante microglía con fenotipo citotóxico por las regiones interplaca y el proceso neurodegenerativo en la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP entre los 4 y 6 meses de edad.

3.4. Estudio de la administración oral crónica de carbonato de litio sobre la neurodegeneración temprana en la corteza entorrinal

En el último objetivo se planteó analizar el posible efecto neuroprotector del litio en la corteza entorrinal de este modelo PS1xAPP. Para ello, los animales fueron mantenidos durante seis meses, desde los 3 a los 9 meses de edad, con una dieta suplementada con carbonato de litio. Como controles, se utilizaron animales transgénicos PS1 alimentados con la dieta rica en litio y animales PS1xAPP a lo que se les suministró una dieta estándar. Tras el tratamiento, se analizó la densidad neuronal de las poblaciones de interneuronas más severamente afectadas como son las que expresan SOM y aquellas que expresan NPY. También, se analizó la deposición extracelular de A β , la activación microglial y astrogial y la fosforilación de tau.

3.4.1. La administración crónica oral de carbonato de litio en los animales PS1xAPP previene la muerte neuronal en la corteza entorrinal

Para determinar el posible efecto neuroprotector del litio en la corteza entorrinal realizamos, en primer lugar, un estudio preliminar cualitativo de la densidad neuronal mediante inmunomarcaje con el anticuerpo NeuN (Fig. 3.88). El análisis cualitativo mostró que los animales PS1xAPP tratados con litio presentaban, aparentemente, una densidad neuronal similar a los animales PS1 de mantenimiento, mientras que los animales PS1xAPP con dieta estándar presentaban una marcada disminución de neuronas NeuN-positivas en las capas profundas. Estos resultados sugerían que, efectivamente, el litio promueve la supervivencia neuronal en este modelo.

3.4.2. El litio ejerce un efecto neuroprotector sobre las neuronas que expresan SOM y NPY en los animales PS1xAPP

A continuación, analizamos, desde el punto de vista cuantitativo mediante esterología, la población de interneuronas SOM-positivas en los animales PS1xAPP tratados

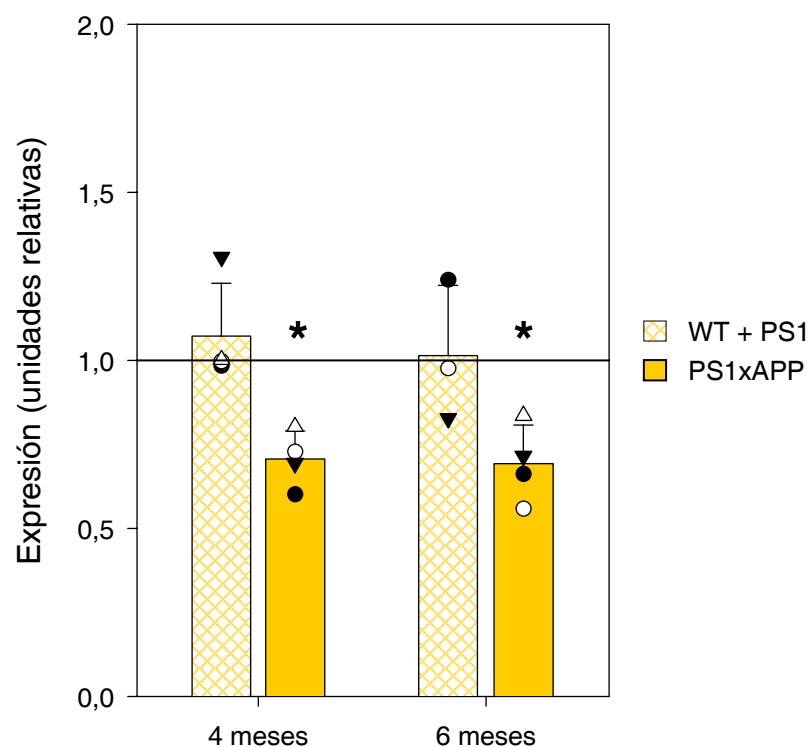


Figura 3.87. Cuantificación del ARNm de la quimioquina fractalquina. Estudio mediante RT-PCR en corteza entorrinal microdiseccionada por láser a edades tempranas (4 y 6 meses de edad). La fractalquina es una quimioquina que puede actuar como molécula de adhesión o como quimioatrayente de los componentes celulares del sistema inmune. Tanto a los 4 como a los 6 meses de edad, los niveles de expresión del ARNm para fractalquina se reducen en los animales PS1xAPP en comparación con los WT de la misma edad ($-29,38 \pm 8,32\%$ y $-30,74 \pm 11,50\%$, respectivamente). ADEVA $F(3,11)=7,59$ $p=0,005$; Tukey $p<0,02$. $n=4$; $*p<0,05$.

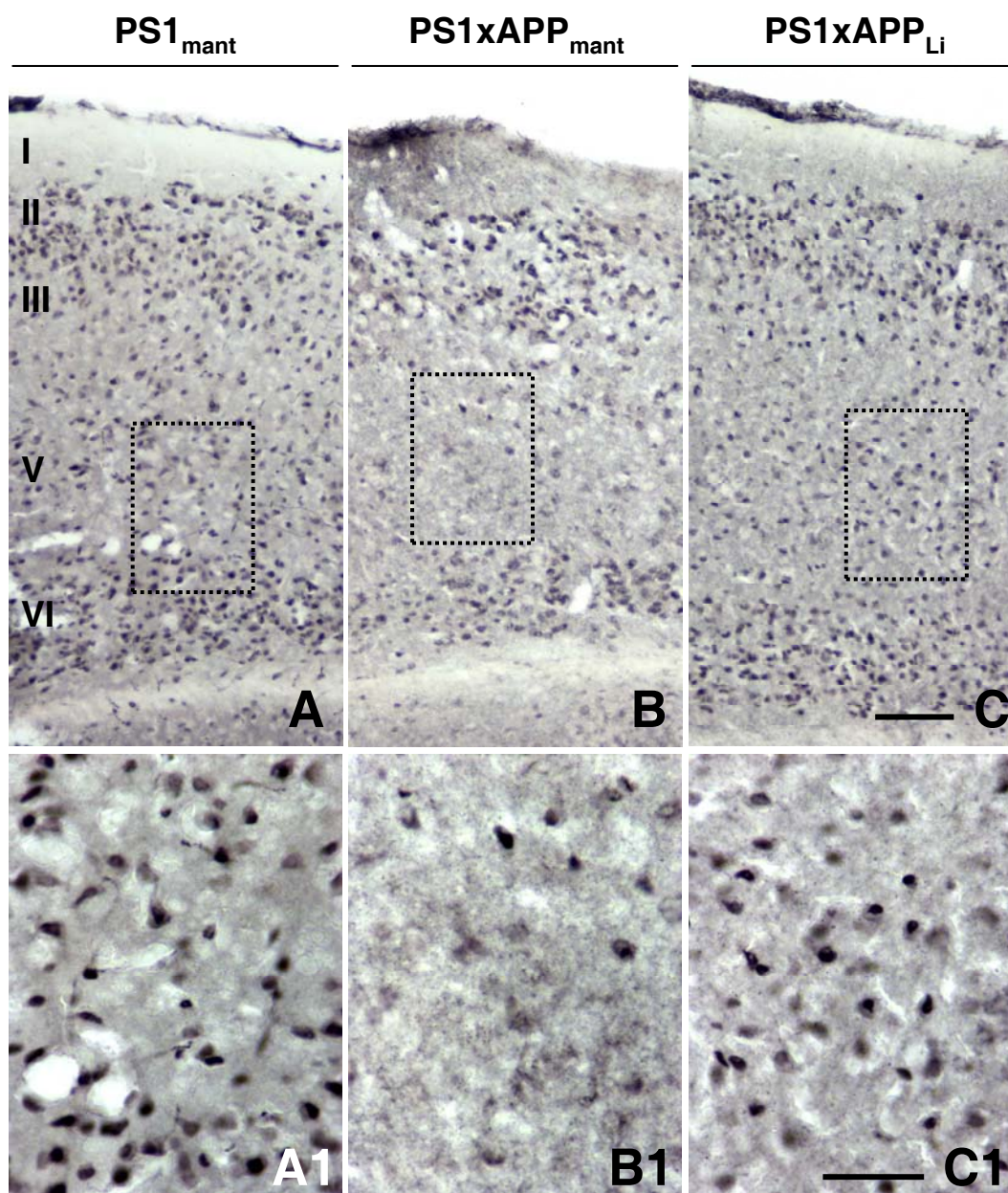


Figura 3.88. Efecto neuroprotector del litio en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP. Estudio inmunohistoquímico para NeuN en animales PS1 con dieta de mantenimiento (A), PS1xAPP de mantenimiento (B) y PS1xAPP con dieta de litio (C). Los animales PS1xAPP con dieta estándar (mantenimiento, B) tienen, desde un punto de vista cualitativo, una menor densidad de neuronas NeuN-positivas, principalmente en capas profundas, en comparación con los controles PS1 con dieta de mantenimiento (A). Es de destacar que los animales doble transgénicos PS1xAPP con tratamiento crónico oral con carbonato de litio (desde los 3 a los 9 meses de edad) presentan una densidad de neuronas NeuN-positivas aparentemente superior a los animales PS1xAPP con dieta estándar. En las imágenes A1-C1 se muestra a mayor detalle la inmunorreactividad para NeuN en capas profundas de los grupos PS1 mantenimiento, PS1xAPP mantenimiento y PS1xAPP litio, respectivamente. El número de núcleos neuronales NeuN-positivos es claramente superior en los animales PS1xAPP tratados con litio (C1) respecto a los no tratados (B1). Barras de escala: 100 μ m (A-C); 50 μ m (A1-C1).

con litio y en los animales control PS1 de mantenimiento y PS1xAPP de mantenimiento. Las imágenes de microscopía convencional (Fig. 3.89 A-C) mostraron una gran cantidad de neuronas SOM-positivas en los animales PS1 de mantenimiento tal y como ocurría en los WT, mientras que en los animales PS1xAPP de mantenimiento se observó una drástica disminución de esta población y aparición de neuritas distróficas inmunomarcadas en la corteza entorrinal. Sin embargo, en los animales PS1xAPP de litio el número de neuronas que se marcaban con el anticuerpo contra SOM era mayor que en los controles con dieta estándar. Además, en ellos no se observó la aparición de neuritas distróficas SOM-positivas. Por lo tanto, los resultados indicaban una aparente protección de las neuronas que expresan SOM en los animales tratados con litio. Para dilucidar esta cuestión, realizamos la cuantificación estereológica de estas interneuronas, como se muestra en la Fig. 3.89 D. Mientras que la densidad numérica de interneuronas SOM-positivas en los animales PS1xAPP de mantenimiento disminuyó un $52,18 \pm 15,58\%$ (T de Student, $p < 0,01$; $n=3$) tal y como era de esperar, en los animales PS1xAPP tratados con la dieta de litio no existían diferencias significativas con respecto a los controles PS1. Los datos indicaban un aumento significativo del $36,61 \pm 5,24\%$ (T de Student, $p < 0,05$) en esta población celular en los animales tratados respecto a los no tratados, lo que suponía que alcanzaban un 84% del valor de los animales control. Este hecho es de gran importancia, ya que el tratamiento con litio previene la muerte temprana de una de las poblaciones de interneuronas más severamente afectadas en este modelo animal.

Otra de las poblaciones neuronales gravemente afectadas por el proceso neurodegenerativo en los animales PS1xAPP era aquella que expresa NPY, por lo que el siguiente paso fue estudiar esta población en los animales PS1xAPP con una dieta rica en litio. El estudio cualitativo de esta población neuronal mediante inmunohistoquímica (Fig. 3.90 A-C) reveló, al igual que pasaba con la SOM, que en los animales PS1xAPP con dieta suplementada con litio las neuronas NPY-positivas presentaban un patrón y una densidad similar a los controles (PS1 mantenimiento), mientras que en los doble transgénicos con dieta estándar el número de neuronas fue marcadamente inferior y con una apreciable cantidad de neuritas distróficas. Es más, en los animales tratados no se detectaron neuritas distróficas positivas para NPY, indicando que esta población se encontraba en condiciones normales no degenerativas. Esto fue confirmado con la cuantificación estereológica de esta subpoblación neuronal (Fig. 3.90 D). En concreto, se determinó un aumento significativo del $49,11 \pm 6,86\%$ (T de Student, $p < 0,01$; $n=3$) de la densidad neuronal de NPY en los animales PS1xAPP con dieta suplementada con litio, en comparación con los animales PS1xAPP de mantenimiento que mostraban una reducción del $43,06 \pm 7,31\%$ (T de Student, $p < 0,05$). Por lo tanto, el tratamiento con litio consigue proteger totalmente a la población NPY-positiva de la neurodegeneración temprana en este modelo animal.

Esto coincide con los resultados previos obtenidos por nuestro grupo de investigación (no publicados) en los que se ha cuantificado las poblaciones que expresan SOM y NPY en el hipocampo de animales PS1xAPP tras el mismo tratamiento con litio, en los que se muestra que estas poblaciones hipocámpicas tampoco se ven afectadas por el proceso neurodegenerativo tras la ingesta de litio.

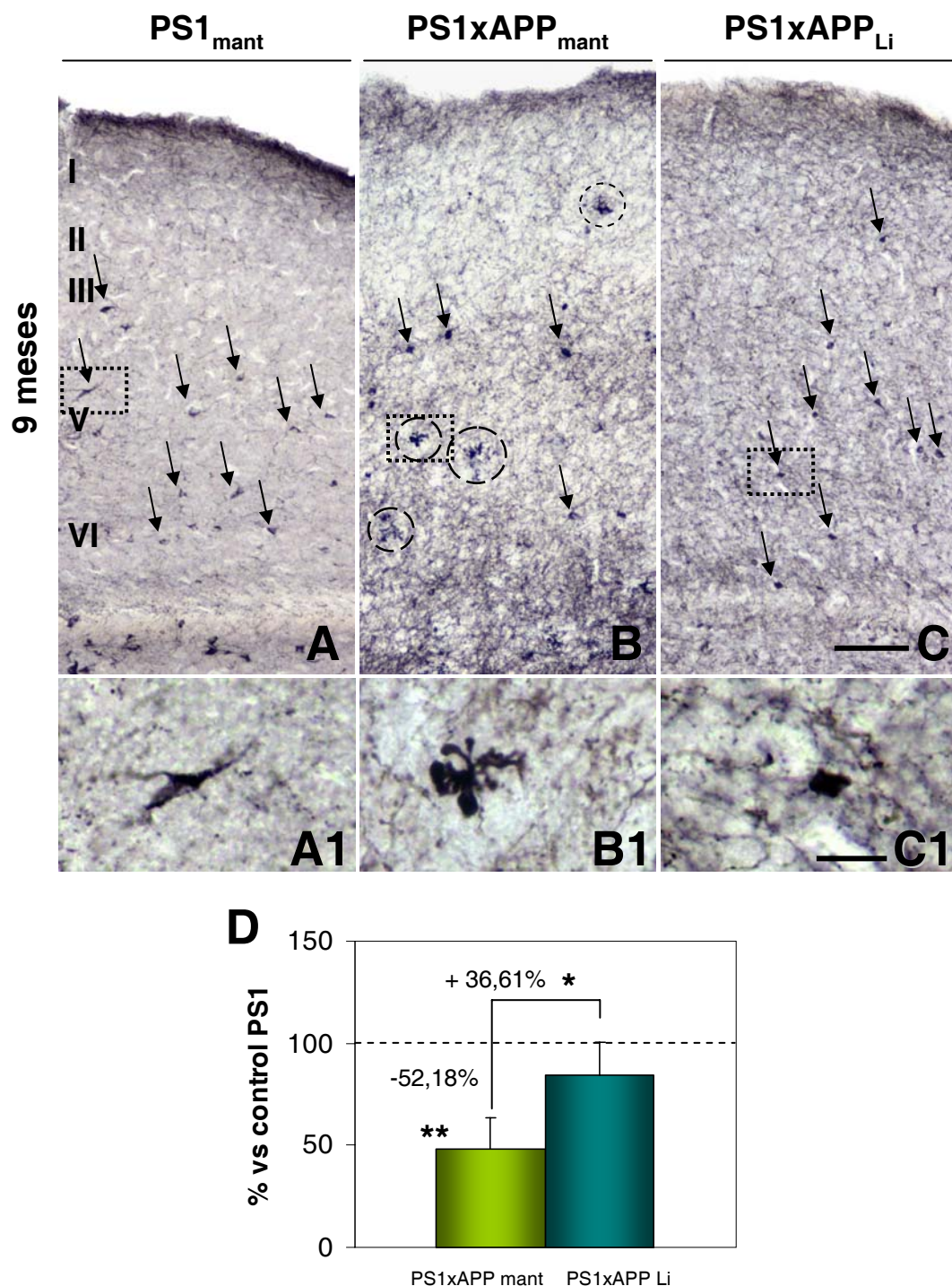


Figura 3.89. Efecto neuroprotector del litio sobre las interneuronas SOM-positivas en la corteza entorrinal. A-C) Inmunohistoquímica para SOM en animales PS1 (A) y PS1xAPP (B) con dieta estándar (mantenimiento) y animales PS1xAPP con dieta de litio (C). D) Estudio estereológico. Los animales PS1xAPP que recibieron tratamiento con litio desde los 3 a los 9 meses de edad presentan una densidad de células SOM-positivas (flechas en C y C1) bastante similar a los animales PS1 (flechas en A, detalle en A1) y claramente superior a los animales PS1xAPP (flechas en B) con una dieta estándar. Además, los animales tratados con litio no desarrollan neuritas distróficas SOM-positivas, al contrario de los animales PS1xAPP con dieta estándar (círculos en B y detalle en B1). La cuantificación estereológica muestra un aumento significativo en la densidad de las neuronas SOM-positivas en los animales PS1xAPP tratados con litio respecto a los animales con dieta estándar, alcanzando casi los niveles de los animales PS1. Barras de escala: 100 μ m (A-C); 20 μ m (A1-C1). n=3, T de Student, *p<0,05; **p<0,01.

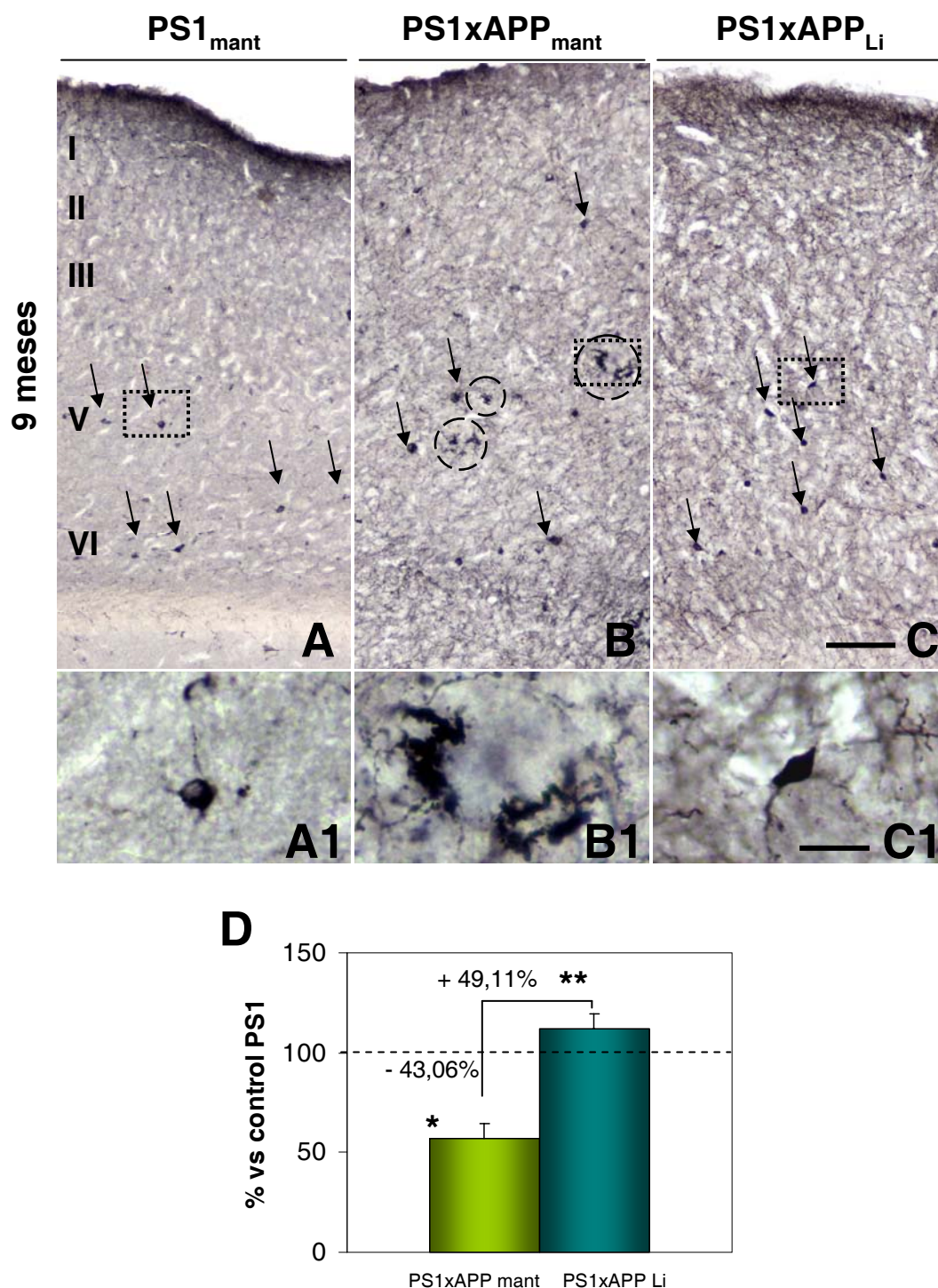


Figura 3.90. Efecto neuroprotector del litio sobre las interneuronas NPY-positivas en la corteza entorrinal. A-C) Inmunohistoquímica para NPY en animales PS1 (A) y PS1xAPP (B) con dieta estándar (mantenimiento) y animales PS1xAPP con dieta de litio (C). D) Estudio estereológico. Los animales PS1xAPP que recibieron tratamiento con litio presentan una densidad de células NPY-positivas (flechas en C y C1) muy similar a los animales PS1 (flechas en A, detalle en A1) y superior a los animales PS1xAPP (flechas en B) con una dieta estándar. Además, los animales tratados con litio no desarrollan neuritas distróficas NPY-positivas, mientras que los animales PS1xAPP con dieta estándar presentan un elevado número (círculos en B y detalle en B1). La cuantificación de las neuronas NPY-positivas muestra un aumento significativo en la densidad celular en los animales PS1xAPP tratados con litio respecto a los animales con dieta estándar, incluso superior a los controles PS1. Barras de escala: 100 μ m (A-C); 20 μ m (A1-C1). n=3, T de Student; *p< 0,05, **p<0,01.

3.4.3. El tratamiento con litio no parece afectar a la carga amiloide en la corteza entorrinal pero sí al tipo de placa

Para conocer el efecto de la administración de litio sobre la carga amiloide, analizamos en primer lugar las placas extracelulares empleando el anticuerpo 6E10 (Fig. 3.91 A y D). En los animales PS1xAPP de litio aparecía una gran cantidad de placas inmunomarcadas en la corteza entorrinal, al igual que en los animales PS1xAPP de mantenimiento, concentrándose sobre todo en las capas profundas las de mayor tamaño. Sin embargo, de forma cualitativa, en los animales tratados con litio parecía existir un menor número de placas pequeñas, sobre todo en las capas superficiales de la corteza entorrinal. Por otro lado, empleando los mismos animales para el análisis, realizamos una inmunohistoquímica para las formas oligoméricas empleando el anticuerpo NU4 (Fig. 3.91 B y E). Con este marcador se podía apreciar una menor cantidad de placas en los animales PS1xAPP de litio que en los de mantenimiento o, al menos, éstas aparentaban ser más difusas. Es posible que la carga amiloide en ambos grupos experimentales (con y sin dieta suplementada con litio) fuese similar, pero el aspecto de las placas parecía menos compacto en aquellos animales tratados con litio. Por último, realizamos un marcaje para APP empleando una contratación con rojo congo en los mismos animales (Fig. 3.91 C y F) para conocer el estado de las neuritas distróficas y su relación con los depósitos congofílicos. El resultado fue que apenas existían diferencias entre los animales PS1xAPP de mantenimientos y los de litio. En ambos animales las placas aparecían principalmente en las capas profundas de la corteza entorrinal y el APP continuaba marcando una cantidad considerable de neuritas distróficas (glutamatérgicas) alrededor de los depósitos extracelulares marcados con rojo congo, por lo que, a este respecto, la dieta suplementada en litio no hacía variar los depósitos fibrilares congofílicos, aunque sí condicionaba el depósito de las formas oligoméricas.

3.4.4. El tratamiento con litio disminuye la activación microglial clásica en la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP

Nuestro siguiente paso fue analizar el efecto que podría tener la administración crónica de carbonato de litio en los animales PS1xAPP en el proceso inflamatorio. Para ello, realizamos un estudio de la microglía, empleando el anticuerpo Iba1 (Fig. 3.92). En los animales PS1xAPP de mantenimiento, la microglía activada Iba1-positiva se encontraba tanto alrededor de las placas de A β como en las zonas interplaca (Fig. 3.92 B) tal y como ya conocíamos. Sin embargo, los animales PS1xAPP con dieta suplementada con litio presentaban microglía activada aparentemente sólo alrededor de las placas, mientras que apenas existía activación microglial interplaca, lo que implica una reducción de la respuesta inflamatoria citotóxica generalizada (Fig. 3.92 C). Estas regiones interplaca presentaban microglía de aspecto residente, muy similar a los animales control PS1 de mantenimiento (Fig. 3.9 2A). Además, parecía que el número de placas rodeadas por microglía activada en los animales tratados con litio era menor que en los animales con dieta estándar. Se sabe

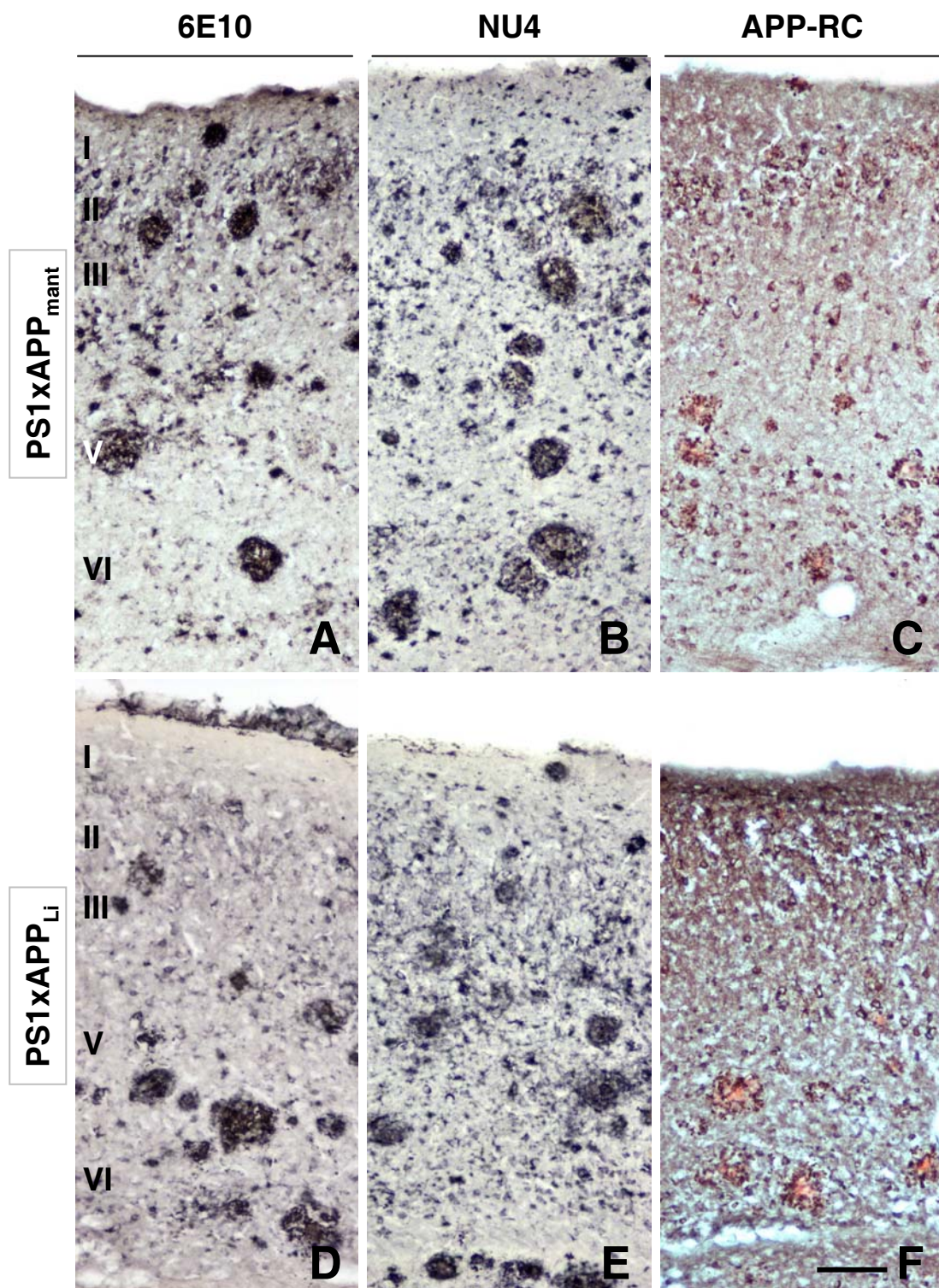


Figura 3.91. El tratamiento con carbonato de litio no parece afectar la formación de depósitos de A β . Inmunohistoquímica para 6E10 (A y D), NU4 (B y E) y APP/rojo congo (C y F) en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP mantenimiento (A-C) y PS1xAPP tratados con litio (D-F) de 9 meses de edad. En los animales PS1xAPP tratados con litio parece existir el mismo número y tamaño de placas marcadas con 6E10, NU4 (A β oligomérico) y rojo congo (A β fibrilar) que en los animales PS1xAPP con dieta de mantenimiento. Sin embargo, el aspecto de las placas parece más difuso en el caso de los animales tratados con litio. Barra de escala: 100 μ m.

que son las placas neuríticas y no las difusas las que reclutan microglía a su alrededor (Nagele y col., 2004), por lo que podría ser que el litio aumentara la proporción de placas difusas (como parece indicar el estudio con el anticuerpo NU4 descrito en el apartado anterior) y disminuyera la cantidad de placas neuríticas.

Para conocer si la astrogliía productora del factor citotóxico NO también se veía reducida tras la administración crónica de carbonato de litio en la dieta, realizamos una inmunohistoquímica para iNOS (Fig. 3.93). Los animales PS1xAPP de mantenimiento, tal y como era de esperar, presentaban una gran activación astrogliial con expresión de iNOS a lo largo de toda la columna cortical. Sin embargo, los animales alimentados con suplemento de litio mostraban una notable reducción de la densidad de astrogliía inmunopositiva para iNOS. Los animales control PS1 con dieta estándar no mostraban inmunorreactividad para la enzima iNOS a lo largo de la corteza entorrinal.

Por lo tanto, el tratamiento crónico con litio provoca una disminución de la activación gliial citotóxica (microglía y astrogliía). Esto podría explicar, al menos en parte, el efecto neuroprotector del litio en este modelo animal.

3.4.5. El tratamiento con litio disminuye la densidad de neuritas distróficas inmunomarcadas con AT8 en los animales PS1xAPP

Debido a que el litio es un potente inhibidor de la enzima GSK3 y ésta está implicada en la fosforilación de tau, finalmente, analizamos la expresión de tau hiperfosforilada mediante el inmunomarcaje con el anticuerpo AT8 (Fig. 3.94). En los animales PS1xAPP de mantenimiento, el inmunomarcaje aparecía en una gran cantidad de neuritas distróficas que se agrupaban alrededor de las placas extracelulares de A β a lo largo de toda la columna cortical. Sin embargo, en los animales PS1xAPP con dieta suplementada con litio era evidente, desde un punto de vista cualitativo, una menor cantidad de neuritas distróficas AT8-positivas rodeando las placas amiloides que en los animales PS1xAPP de mantenimiento (Fig. 3.94 B1 y C1). Los animales control PS1 no presentaban inmunomarcaje positivo con el anticuerpo AT8 en la corteza entorrinal.

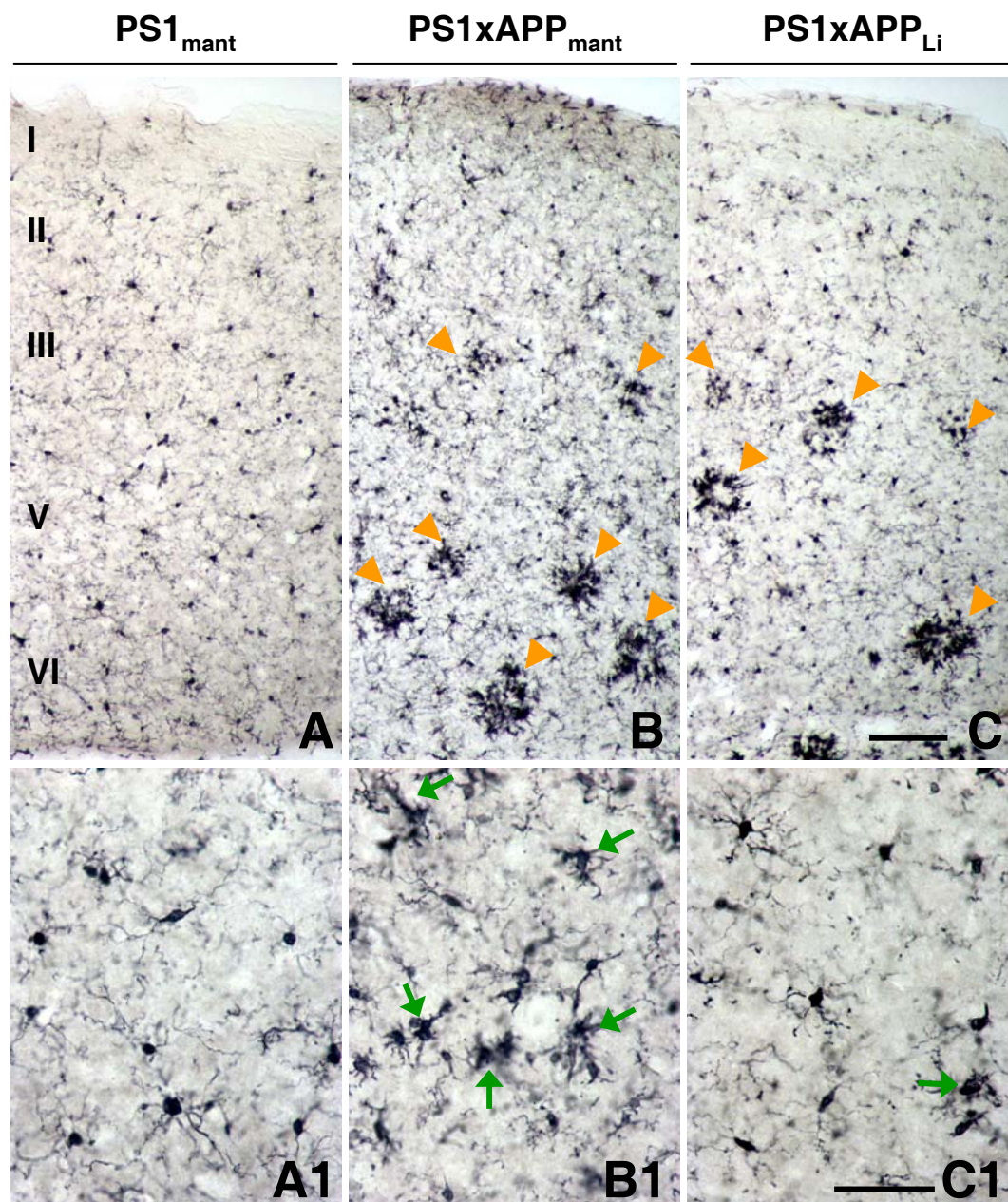


Figura 3.92. El tratamiento con carbonato de litio disminuye la activación microglial interplaca en la corteza entorrinal. Estudio inmunohistoquímico para Iba1 en animales PS1 con dieta de mantenimiento (A), PS1xAPP de mantenimiento (B) y PS1xAPP con dieta de litio (C). En los animales control PS1, no existe activación microglial (A), mientras que, en los animales PS1xAPP de mantenimiento (B), la microglía aparece activada tanto en los alrededores de las placas amiloides (cabezas de flecha) como en las zonas interplaca (flechas), con prolongaciones más cortas y gruesas, como puede apreciarse en el detalle B1. Sin embargo, en los animales PS1xAPP tratados con litio (C), existe un menor número de células microgliales activadas (flecha en C1), aunque sigue existiendo microglía activada alrededor de los depósitos extracelulares de A β . Barras de escala: 100 μ m (A-C); 50 μ m (A1-C1).

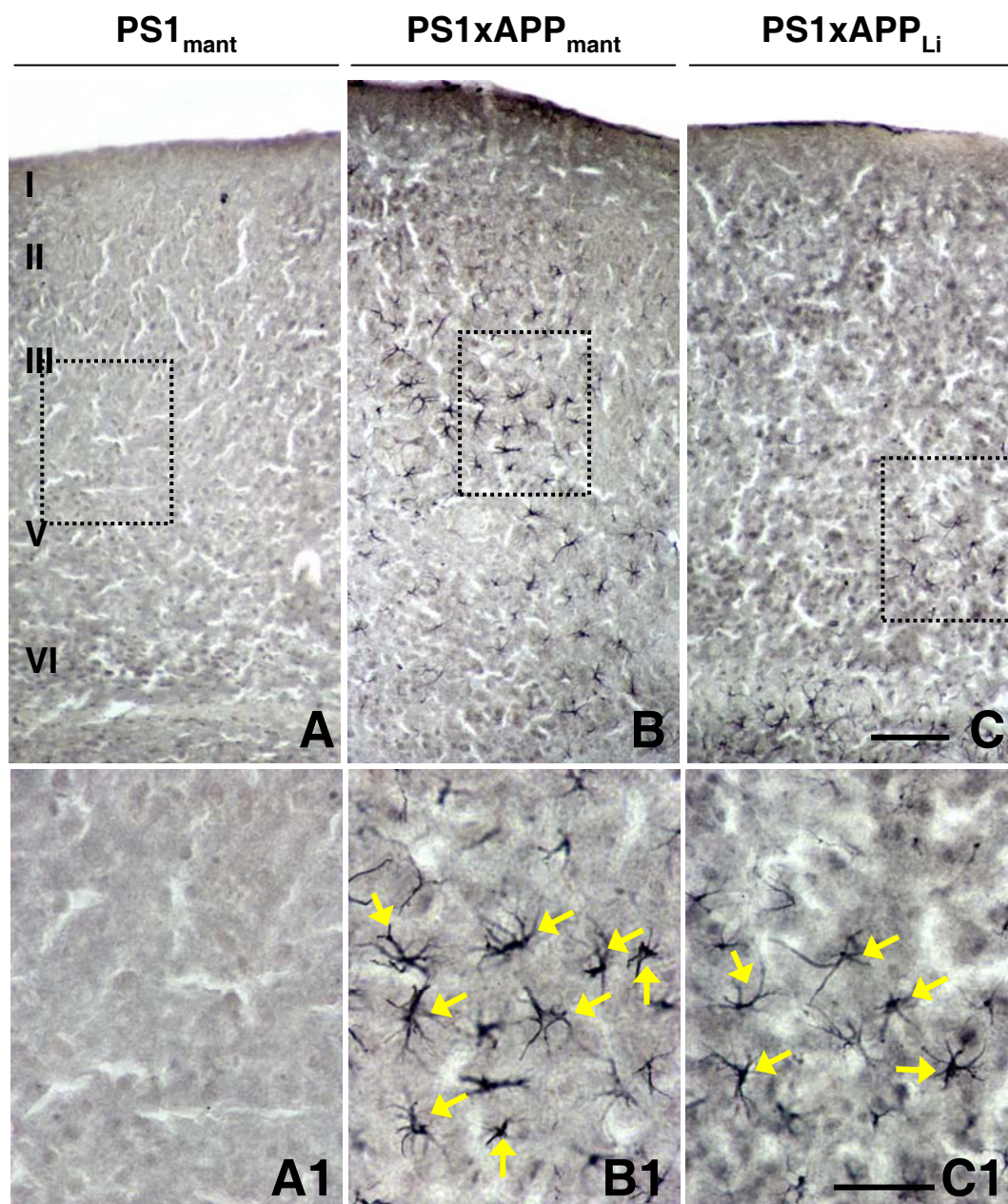


Figura 3.93. Efecto neuroprotector del litio en la corteza entorrinal de animales PS1xAPP. Estudio inmunohistoquímico para iNOS en animales PS1 con dieta de mantenimiento (A), PS1xAPP de mantenimiento (B) y PS1xAPP con dieta de litio (C). Los animales PS1xAPP con dieta estándar (B) presentan una elevada producción de iNOS por parte de las astrocitos reactivos (flechas) a lo largo de la columna cortical. En los animales tratados con litio (C), la densidad de células astrogiales que expresan iNOS es menor que en los animales de mantenimiento. Estas células inmunorreactivas se concentran, principalmente, en las capas profundas de la corteza entorrinal. En los animales control PS1 (A) no existe inmunorreactividad para iNOS. Barras de escala: 100 μ m (A-C); 50 μ m (A1-C1).

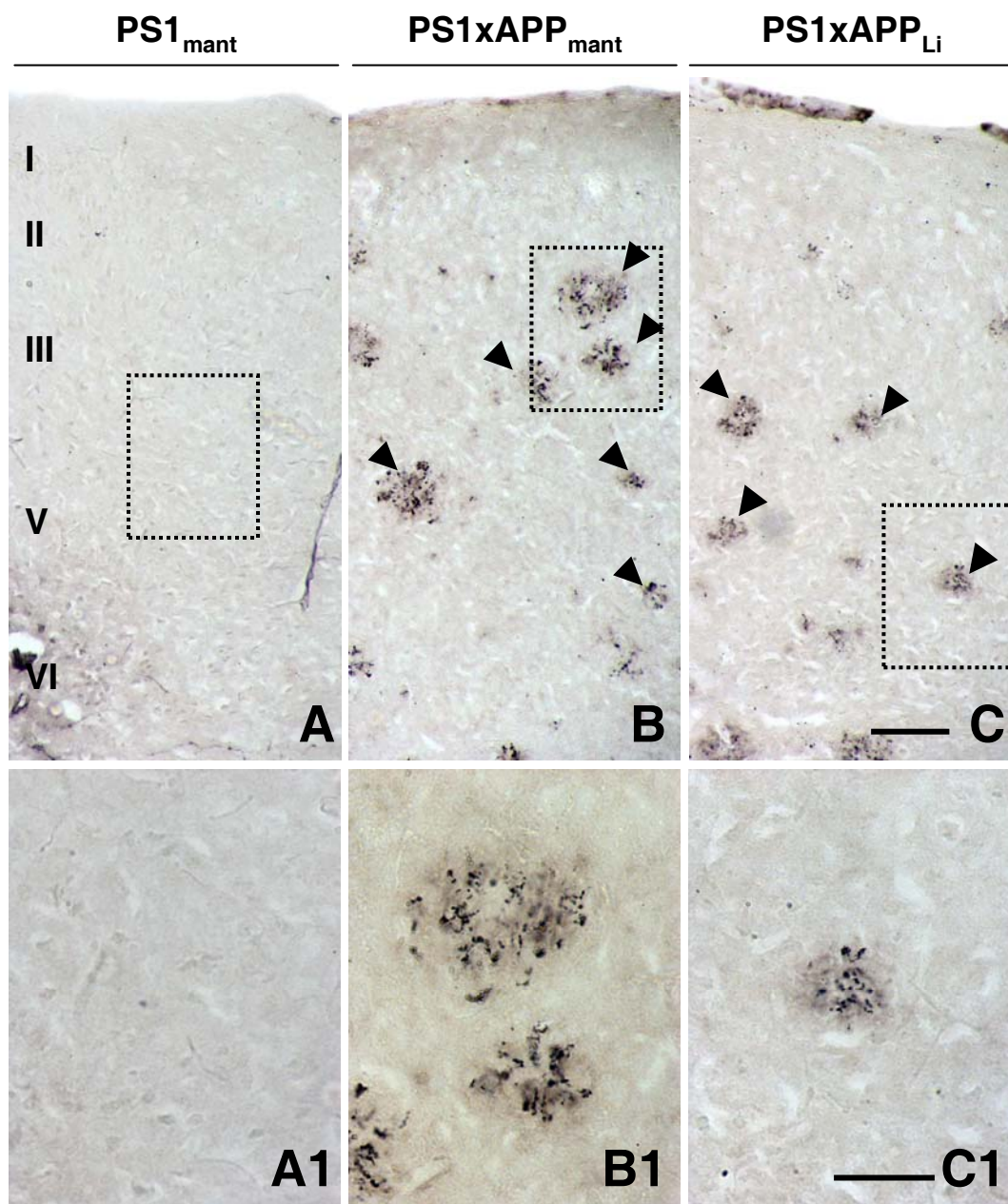


Figura 3.94. La administración de litio reduce la densidad de neuritas distróficas. Estudio inmunohistoquímico para AT8 en animales PS1 con dieta de mantenimiento (A), PS1xAPP de mantenimiento (B) y PS1xAPP con dieta de litio (C). La presencia de neuritas distróficas inmunomarcadas para AT8 (tau hiperfosforilado) aparece en los animales PS1xAPP de mantenimiento (B) alrededor de las placas amiloides (cabezas de flecha) a lo largo de la columna cortical. Por su parte, los animales PS1xAPP con tratamiento de litio (C) presentan, cualitativamente, un menor número de neuritas inmunomarcadas. B1 y C1 muestran con mayor detalle placas rodeadas por neuritas AT8-positivas en animales PS1xAPP sin (B) y con (C) tratamiento de litio. Los animales control PS1 (A y A1) no muestran inmunorreactividad con el anticuerpo contra AT8. Barras de escala: 100 μ m (A-C); 50 μ m (A1-C1).

4. Discusión

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se ha analizado la vulnerabilidad neuronal asociada a la patología amiloidea en la corteza entorrinal lateral del modelo doble transgénico PS1_{M146L}XAPP_{751SL} para la enfermedad de Alzheimer. Además, se ha estudiado el papel del A β extracelular/intracelular y de la respuesta neuroinflamatoria como posibles agentes causantes de la muerte neuronal en esta región cerebral. Por último, se ha examinado el efecto del tratamiento crónico con carbonato de litio sobre la supervivencia neuronal en este modelo.

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

1. Existe pérdida neuronal selectiva, tanto de interneuronas como de neuronas principales, en la corteza entorrinal de este modelo *in vivo* de EA a edades tempranas (6 meses de edad):
 - Las principales poblaciones de interneuronas (aquellas que expresan SOM, NPY, PV ó CR) muestran una vulnerabilidad diferencial al proceso neurodegenerativo en este modelo. La población más afectada es la que expresa SOM y/o NPY, con una disminución muy prominente (56-46%), siendo ésta similar en capas superficiales y profundas. Por otro lado, las interneuronas CR-positivas también sufren un proceso neurodegenerativo temprano, aunque menos notable (17%), siendo las más vulnerables aquellas situadas en capas profundas. Sin embargo, las interneuronas que expresan PV no se ven afectadas por el proceso neurodegenerativo en este modelo con el transcurso de la edad.
 - Las neuronas principales muestran una vulnerabilidad diferencial a lo largo de la columna cortical, de tal forma que sufren neurodegeneración selectiva (27%) las de capas profundas (principalmente capa V), mientras que las de capas superficiales no muestran cambios.
2. La muerte de las neuronas de la corteza entorrinal en este modelo transgénico no es consecuencia de una acumulación intracelular de A β , sino que se correlaciona con los depósitos de A β extracelular:
 - Las interneuronas y la mayoría de las neuronas principales de capa V no expresan ni acumulan A β . Estas células no expresan el transgén humano APP mutado y no son inmunorreactivas para el anticuerpo 6E10. Además, no se ha detectado marcaje intracelular para A β ₁₋₄₂ en estas neuronas, incluso tras el tratamiento con ácido fórmico. Por el contrario, sí existe acumulación de A β intracelular en neuronas de otras regiones como la corteza motora (específicamente en capa V) y el subículo. Es más, las neuronas de capa V de la corteza motora que acumulan A β intracelular desde los 2 meses de edad no sufren muerte neuronal, al menos a los 6 meses.
 - La deposición de A β extracelular se correlaciona espacial y temporalmente con la muerte neuronal. La presencia de las placas es detectable a los 4 meses de edad y ocurre preferentemente en las capas profundas, hecho que se correlaciona con la

conectividad entorrinal y la liberación sináptica de A β . El número y tamaño de las placas aumenta progresivamente con la edad.

3. El A β extracelular induce una respuesta inflamatoria con un perfil potencialmente citotóxico en la corteza entorrinal a edades tempranas (4-6 meses), a diferencia del hipocampo, donde a la misma edad, la activación glial tiene un papel neuroprotector:
 - Existe activación glial (astroglía y microglía) desde los 4 meses de edad, coincidente con la aparición de las placas de A β . A esta edad, la microglía activada se localiza exclusivamente alrededor de las placas y muestra un fenotipo alternativo (potencialmente neuroprotector, expresión de IGF1 y capacidad fagocítica).
 - Sin embargo, a los 6 meses de edad, la activación microglial se expande a las regiones interplaca. Esta microglía activada interplaca muestra un fenotipo clásico (citotóxico) con producción de TNF α (microglía interplaca) e iNOS (astroglía reactiva) y con un aumento de expresión de receptores de muerte y sus ligandos. Este ambiente potencialmente citotóxico coincide en el tiempo con la muerte de neuronas en la corteza entorrinal.
4. El tratamiento crónico con carbonato de litio en la dieta reduce notablemente el proceso neurodegenerativo (disminución acusada de la formación de neuritas distróficas y de la muerte neuronal), así como el proceso inflamatorio (reducción de la activación microglial clásica) en la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP.

4.1. Neurodegeneración selectiva de interneuronas en la corteza entorrinal del modelo PS1xAPP a edades tempranas

4.1.1. Las interneuronas que expresan SOM y/o NPY son altamente vulnerables en las fases tempranas de la patología amiloide

Aunque la pérdida neuronal es una de las principales marcas histopatológicas de la EA, muchos modelos animales de esta enfermedad no desarrollan un proceso neurodegenerativo y, si lo hacen, aparece a edades muy avanzadas. Estudios previos de nuestro grupo de investigación han demostrado la pérdida temprana y selectiva de interneuronas SOM/NPY positivas (50-60%) en el hipocampo de este modelo animal (Ramos y col., 2006) y durante el proceso normal de envejecimiento (Vela y col., 2003). La corteza entorrinal, junto con el hipocampo, son las regiones que primero y más severamente se ven afectadas en los pacientes de Alzheimer.

En el presente trabajo, hemos demostrado mediante estudios inmuno-histoquímicos, cuantificación estereológica y RT-PCR en muestras microdisecionadas por láser, que en la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP las subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas que expresan SOM y/o NPY se ven preferentemente afectadas, con una disminución del 56% y el 46%, respectivamente, a los 6 meses de edad. Esta disminución en la densidad de neuronas que expresan estos neuropéptidos no sigue progresando con la edad y se mantiene a los 12 y 18 meses de edad, lo que indica que las interneuronas SOM/NPY-positivas no forman una población homogénea y que existe una subpoblación altamente vulnerable y otra resistente al proceso neurodegenerativo. Además, la pérdida de interneuronas SOM-positivas a los 6 meses de edad se correlaciona con una disminución significativa (23%) en los niveles de expresión de su ARNm. Otro dato que confirma la pérdida de neuronas GABAérgicas en la corteza entorrinal de este modelo PS1xAPP, es la disminución de los niveles de ARNm del marcador VGAT (específico de sinapsis GABAérgicas) en un 34% a los 6 meses de edad.

Además, hemos encontrado neuritas distróficas positivas tanto para SOM como para NPY e, incluso, muchas de ellas co-expresaban ambos marcadores, de manera similar a lo observado en humanos (Morrison y col., 1985; Nakamura y Vincent, 1986; Kowall y Beal, 1988). La presencia de neuritas distróficas inmunopositivas para SOM y NPY y la existencia de una pérdida de neuronas NeuN-positivas en los estudios de doble marcaje SOM/NeuN, indican que la disminución en la densidad de somas SOM-positivos así como en los niveles de ARNm para SOM, no se debe a un proceso de hipofuncionalidad neuronal, sino que existe un proceso neurodegenerativo en la corteza entorrinal lateral de este modelo animal.

Esta pérdida significativa (50-60%) de neuronas SOM/NPY ocurre en las dos regiones cerebrales más afectadas por la patología amiloidea (carga amiloide) como son el hipocampo y la corteza entorrinal. Otras regiones corticales con menor carga amiloide, como la corteza auditiva, muestran un menor porcentaje de pérdida de neuronas SOM-positivas (34%) (del Rio, 2005; Moreno-Gonzalez y col., 2009). La región rostral del estriado, con

escasos o ningún depósito amiloide, no muestra cambios en la densidad de interneuronas SOM-positivas (Ramos y col., 2006).

La disminución de los neuropéptidos SOM, principalmente, y de NPY es un hecho constatado en la enfermedad de Alzheimer. Esta reducción de los niveles de SOM/NPY ha sido confirmado tanto en tejido post-mortem cortical (lóbulo temporal y frontal mayoritariamente) e hipocampal como en líquido cefalorraquídeo (Davies y col., 1980; Arai y col., 1984; Beal y col., 1986a; Reinikainen y col., 1987; Mazurek y Beal, 1991; Gabriel y col., 1993; Dournaud y col., 1995; Vecsei y Klivenyi, 1995; Grouselle y col., 1998; Nag y col., 1999; Van de Nes y col., 2002). Esta disminución ha sido atribuida a la muerte de interneuronas que expresan dichos neuropéptidos (Morrison y col., 1985; Nakamura y col., 1986; Gaspar y col., 1989; Davis y col., 1999; Kumar, 2005). De hecho, la disminución de los niveles de SOM (con pérdida de interneuronas) es un proceso que también tiene lugar como consecuencia del proceso de envejecimiento normal tanto en humanos (Lu y col., 2004) como en rata (Florio y col., 1991; Vela y col., 2003). Por lo tanto, nuestro modelo animal mimetiza la pérdida de SOM/NPY observada en pacientes de EA. La implicación patofisiológica de la pérdida de estas neuronas se discute más adelante.

4.1.1.1. Heterogeneidad en la población de interneuronas SOM y/o NPY-positivas ante el proceso neurodegenerativo

Hemos demostrado que existe muerte neuronal específica de, aproximadamente, la mitad de la población de interneuronas que expresan SOM y/o NPY en la corteza entorrinal del modelo PS1xAPP a los 6 meses de edad. Sin embargo, el proceso neurodegenerativo de esta población no sigue incrementando con la edad ni con la progresión de la patología amiloidea, manteniéndose constante su densidad celular desde los 6 hasta los 18 meses de edad. Este hecho sugiere la existencia de una heterogeneidad dentro de la población de interneuronas SOM y/o NPY-positivas, de tal forma que una subpoblación es muy vulnerable (desde el inicio de la deposición amiloide) mientras que la otra es altamente resistente, independientemente del grado de expresión del A β . La existencia de esta vulnerabilidad diferencial dentro de la población de neuronas SOM y/o NPY-positivas puede estar determinada por múltiples causas.

Se han descrito hasta tres tipos de interneuronas corticales SOM positivas que difieren en varios aspectos como son la localización laminar, la expresión de marcadores neuroquímicos, la morfología axonal y las propiedades electrofisiológicas (Ma y col., 2006). En nuestro modelo, la localización laminar no es el factor determinante de la diferente vulnerabilidad de esta población, ya que la pérdida de neuronas SOM-positivas en la corteza entorrinal ocurre de forma homogénea en capas superficiales y profundas. Por otro lado, la co-existencia de SOM con proteínas ligadoras de calcio, sobre todo con CR (Cauli y col., 2000; Xu y col., 2006; Gonchar y col., 2008), podría ser uno de los motivos de la diferente vulnerabilidad de esta población, ya que se piensa que el A β puede generar un incremento del calcio intracelular liberado por el retículo endoplasmático, que desencadenaría un proceso apoptótico debido a la activación de la respuesta UPR (unfolding protein response),

aunque no se conoce el mecanismo de actuación (Mattson y col., 1992; Mattson, 1994; Guo y col., 1997; Hölscher, 1998; Mattson y Chan, 2001; Lopez y col., 2008; Ferreiro y col., 2008). Serían necesarios estudios de doble marcaje SOM/CR en la corteza entorrinal de nuestro modelo para determinar si la población de células SOM-positivas resistente es aquella que, precisamente, exprese alguna proteína ligadora de calcio.

Algunos estudios han demostrado que la co-expresión de SOM junto con NPY puede hacer unas interneuronas más vulnerables que otras (Gaspar y col., 1989). Además, las interneuronas que expresan NPY también pueden co-expresar CR, con o sin co-expresión de SOM (Gonchar y col., 2008). En nuestro modelo animal, ambas poblaciones, SOM y NPY, son muy vulnerables. Además, los estudios de doble marcaje a microscopía confocal indican que las interneuronas que co-expresan ambos neuropéptidos parecen ser las más vulnerables en la corteza entorrinal, al igual que ocurre en el hipocampo (Ramos y col., 2006), aunque no hemos realizado estudios cuantitativos de estas poblaciones doblemente marcadas.

La diferente vulnerabilidad de las neuronas SOM-positivas podría radicar también en una innervación diferencial de estas células mediante terminales sinápticos que liberen A β , de tal forma que aquellas que reciban un gran número de aferencias procedentes de neuronas principales productoras de A β serían más vulnerables a la neurodegeneración que las que reciban un número menor de aferencias o cuyas aferencias provengan de otras interneuronas GABAérgicas que no producen A β .

La abundancia de receptores NMDA en las neuronas SOM-positivas (Standaert y col., 1996; Scherzer y col., 1998) podría explicar también la mayor vulnerabilidad de esta población respecto a otras poblaciones de interneuronas. La estimulación de los receptores de glutamato, como el NMDA, bajo condiciones de poca energía disponible o de estrés oxidativo, conduce a una entrada de calcio en los terminales postsinápticos de las dendritas, generando una desregulación iónica, proceso que también se da en el compartimento presináptico, lo que puede conducir a la activación de la vía apoptótica. Por lo tanto, una estimulación prolongada de los receptores NMDA por glutamato podría provocar un incremento letal del calcio intracelular y la muerte neuronal por excitotoxicidad del glutamato (Mattson y Magnus, 2006). Incluso, la activación de estos receptores por el A β podría generar una desestabilización de la homeostasis del calcio neuronal, provocando que las neuronas sean más vulnerables a estímulos externos, ya que compromete la capacidad de las neuronas para controlar la homeostasis interna (Mattson y col., 1992). La presencia de receptores NMDA no es exclusiva de este tipo neuronal, pero podría ser que una mayor cantidad de estos receptores (o de determinadas subunidades) las haga más vulnerables frente a otras subpoblaciones neuronales SOM-positivas con una menor densidad. Es posible que existan diversas poblaciones de neuronas SOM-positivas que difieran en su contenido de receptores NMDA, explicando la existencia de una población altamente vulnerable y otra resistente al proceso neurodegenerativo en nuestro modelo PS1xAPP.

Las células de Martinotti son un tipo de interneurona bipenacheada o multipolar que se caracterizan por expresar siempre el neuropéptido SOM, a veces CB, CCK ó CR, aunque nunca PV ni VIP (DeFelipe, 1997; Kawaguchi y Kubota, 1997; Wang y col., 2004; Toledo-

Rodriguez y col., 2005) y algunas muestran expresión de reelina (Pesold y col., 1998). No todas las interneuronas SOM positivas son células de Martinotti (Toledo-Rodriguez y col., 2005; Ma y col., 2006), encontrando aquí una variabilidad indiscutible dentro de la población de interneuronas SOM positivas. Los axones de las células de Martinotti proyectan hacia la capa I y su principal diana son las dendritas más distales de las neuronas principales (al igual que las células O-LM del hipocampo). Las células de Martinotti son inhibitoras e intervienen en la coordinación entre las distintas capas y columnas corticales (Wang y col., 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 de la corteza entorrinal.

Finalmente, la expresión diferencial de factores pro-supervivencia, como FAIM_L, en las subpoblaciones de interneuronas SOM-positivas podría explicar también la heterogeneidad frente al proceso neurodegenerativo, como veremos más adelante (ver apartado 4.4.2).

4.1.1.2. Implicación de la pérdida de interneuronas SOM/NPY-positivas en los procesos cognitivos

La corteza entorrinal es un componente esencial del sistema LTP del lóbulo temporal medial, ya que es la principal fuente de entrada al hipocampo y la principal diana de salida de éste. Estas entradas y salidas están separadas, debido a que las eferencias hacia el hipocampo parten principalmente de la capa II y III de la corteza entorrinal, mientras que las aferencias que provienen del hipocampo contactan con las neuronas de capa V y VI de la corteza entorrinal (Amaral y Witter, 1989; Insausti col., 1997; Canto y col., 2008).

La considerable pérdida de interneuronas que expresan SOM podría tener una gran repercusión fisiológica en la corteza entorrinal, tanto en nuestro modelo animal como en los pacientes de Alzheimer, debido a las funciones fisiológicas propias de estas interneuronas y a las que realiza este neuropéptido en el cerebro.

La neurodegeneración selectiva de las neuronas SOM-positivas en la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP se traduce en una pérdida de la innervación inhibitora que reciben las neuronas principales procedente de estas células. Esta disminución de conexiones inhibitoras podría provocar un desbalance de la relación inhibición/excitación que reciben las neuronas principales lo que, a su vez, podría aumentar su vulnerabilidad.

En modelos de epilepsia del lóbulo temporal se produce una disminución de la inhibición GABAérgica en las dendritas de las neuronas principales, mientras que la innervación a nivel del soma aumenta, debido a una neurodegeneración de las interneuronas que producen inhibición dendrítica y una hiperactividad de las interneuronas que producen inhibición perisomática, lo que incrementa la actividad epiléptica (Cossart y col., 2001). La reducción de la innervación inhibitora en nuestro modelo, sin embargo, no conlleva a un estado pro-epiléptico. Esta discrepancia entre los modelos de epilepsia y nuestro modelo de EA podría deberse a la ausencia de modificaciones en la inhibición perisomática (células PV) en los animales PS1xAPP. De igual forma, en la corteza entorrinal se pierden las

interneuronas que contactan con las dendritas de las neuronas principales, como las células de Martinotti (SOM-positivas), y se mantienen las interneuronas que inervan la región somática, como son las interneuronas PV-positivas. Por lo tanto, esto puede generar un desbalance de las sinapsis inhibitorias que recibe una neurona principal a lo largo del soma y sus dendritas, afectando a su actividad normal y modificando la información que envía al hipocampo y a las regiones corticales con las que contacta. Por tanto, la pérdida específica de interneuronas GABAérgicas SOM/NPY en la corteza entorrinal e hipocampo a edades tempranas (6 meses de edad) en este modelo podría estar implicada en las deficiencias de memoria y/o aprendizaje características de las fases iniciales de la EA, en ausencia de descargas epilépticas o convulsiones.

En apoyo de esta idea, existen numerosas evidencias de la participación del neuropéptido SOM en los procesos de memoria y aprendizaje. Específicamente, la SOM modula funciones cognitivas y emotivas, aunque su papel exacto no se conoce bien. Se ha determinado que la administración de SOM mejora la memoria, facilitando el aprendizaje tanto en modelos animales de envejecimiento como en pacientes de la EA (Bartus y col., 1982; Schettini, 1991; Craft y col., 1999), mientras que su eliminación (mediante el empleo de cisteamina o por eliminación génica) causa pérdida de memoria debido a la disminución de la potenciación a largo plazo (Haroutunian y col., 1987; Schettini, 1991; Kluge y col., 2008), sobre todo teniendo en cuenta que la corteza entorrinal es la principal entrada y salida del hipocampo. El sistema somatostatinérgico juega un papel crítico en la adquisición de memoria contextual en un modelo de condicionamiento al miedo (Kluge y col., 2008).

Por lo tanto, los cambios en la señalización mediada por SOM (disminución de los niveles por la pérdida neuronal) en regiones como la corteza entorrinal y el hipocampo posiblemente estén implicados en los fallos cognitivos tempranos observados en modelos experimentales y también en pacientes de la EA (Matsuoka y col., 1995).

Por su parte, el NPY también está implicado en las funciones de memoria y aprendizaje, incrementando la retención de memoria. Es capaz de contrarrestar las consecuencias del estrés y la ansiedad, manteniendo la homeostasis emocional (ver revisión Eaton y col., 2007). La administración intracerebroventricular de NPY en ratones mejora la retención de memoria y revierte la amnesia (Flood y col., 1987). Incluso, una disminución de los niveles de NPY en el hipocampo o una disminución de la unión del NPY a su receptor (NPY-Y1) afecta negativamente a la capacidad de memoria espacial (Thorsell y col., 2000). Por lo tanto, podríamos especular que la disminución de los niveles de expresión de NPY o la neurodegeneración de las neuronas NPY-positivas en la corteza entorrinal de nuestro modelo animal podría estar implicada en el déficit de memoria a largo plazo, tal y como ocurre en los pacientes de Alzheimer.

4.1.1.3. Implicación de la pérdida de interneuronas SOM-positivas en los niveles de β -amiloide

Además de la implicación de las neuronas somatostatinérgicas en la regulación de los procesos cognitivos de memoria y el aprendizaje, su pérdida durante el proceso neurodegenerativo también podría repercutir en un aumento de los niveles de $A\beta$. La SOM regula la actividad de la enzima neprilisina, una endopeptidasa que parece ser la principal encargada de degradar $A\beta$ en el cerebro. La expresión de neprilisina disminuye durante el envejecimiento (Saito y col., 2003), favoreciendo el incremento de depósitos de $A\beta$ en sujetos de edad avanzada (Iwata y col., 2001). Por lo tanto, una disminución de los niveles de SOM, ya sea durante el envejecimiento o debido a la EA, induciría una disminución en la actividad de la neprilisina y, consecuentemente, un aumento en los niveles de $A\beta$, generando un círculo vicioso, debido a la toxicidad del $A\beta$ sobre las neuronas, incrementando seguramente la vulnerabilidad de las interneuronas SOM-positivas (Fig. 4.1).

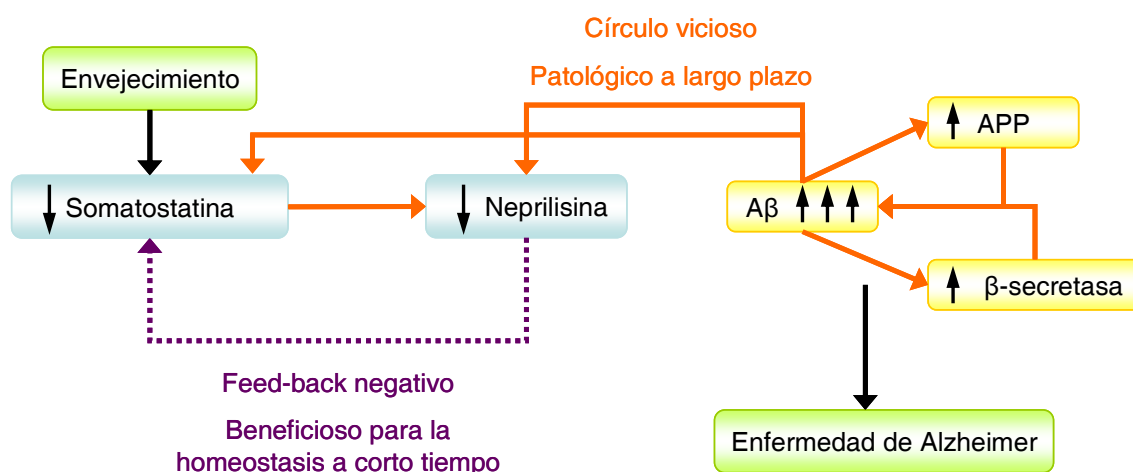


Fig. 4.1. Metabolismo de la somatostatina, neprilisina y β -amiloide. El envejecimiento provoca disminución en la síntesis de neuropeptidos, lo que supone una disminución en los niveles o actividad de la neprilisina que, al ser la encargada de eliminar $A\beta$, provoca su acumulación. La posible neurotoxicidad del $A\beta$ sobre las células SOM generaría la aparición de un círculo vicioso con síntomas patológicos a largo plazo. Modificado de Saito y col., 2003.

Además, el aumento de $A\beta$ generaría un incremento de los niveles de APP soluble (ya que la APP es una proteína de respuesta al estrés) y de la enzima productora de $A\beta$ BACE1, por lo que se crearían dos ciclos de retroalimentación positiva que generaría una gran producción de $A\beta$ (Saito y col., 2003; Hama y Saido, 2005; Saito y col., 2005; Burgos-Ramos y col., 2008). Por este motivo sería fundamental comprobar si la disminución de SOM en nuestro modelo está implicada en el aumento de $A\beta$ con la edad, analizando los niveles de expresión de neprilisina o, incluso, su actividad en los animales PS1xAPP en comparación con los animales control.

4.1.2. Las interneuronas que expresan CR en las capas profundas de la corteza entorrinal son vulnerables al proceso neurodegenerativo a edades tempranas

La proteína ligadora de calcio calretinina está presente en una gran variedad de interneuronas inhibitoras GABAérgicas, como las células bipenacheadas, células bipolares y células doble bouquet (DeFelipe y col., 1990; Miettinen y col., 1997; Markram y col., 2004). Además, es expresada por células Cajal-Retzius (Mikkonen y col., 1997) y por células de Martinotti (Xu y col., 2006; Gonchar y col., 2008). Sin embargo, algunas de las neuronas CR-positivas de capa V de la corteza entorrinal son interneuronas excitadoras de naturaleza glutamatérgica de circuito local, ya que no proyectan al hipocampo (Wouterlood y col., 2000).

El estudio de los niveles de ARNm de CR mediante RT-PCR en muestras microdisseccionadas y la posterior cuantificación de la densidad neuronal mediante estereología en la columna cortical completa no reveló cambios significativos para esta población de interneuronas en la corteza entorrinal de nuestro modelo PS1xAPP. Sin embargo, la presencia de neuritas distróficas inmunopositivas para CR en las capas profundas de la corteza entorrinal nos llevó a pensar que, a diferencia de lo que ocurre con la población de interneuronas SOM-positivas, podían existir cambios selectivos de esta población en capas profundas. Efectivamente, el estudio estereológico determinó la existencia de una disminución significativa de la densidad numérica de las interneuronas CR-positivas (17%) en las capas profundas de la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP a la edad de 6 meses. No se encontraron diferencias en las capas superficiales II y III, ni en la capa I (células Cajal-Retzius CR-positivas). De forma similar, existe neurodegeneración específica de las interneuronas CR-positivas en el hipocampo de nuestro modelo PS1xAPP a edades tempranas (34%, Baglietto-Vargas, 2008) que, al igual que en la corteza entorrinal, supone una disminución menor que la que sufre las neuronas SOM/NPY en el hipocampo. Este gradiente de vulnerabilidad selectiva entre las neuronas SOM/NPY, CR y PV también ha sido observado en el hipocampo de ratas viejas (Vela y col., 2003). Además, en muestras de pacientes de Alzheimer, las neuronas CR-positivas sufren un proceso neurodegenerativo no tan prominente como las interneuronas SOM-positivas (Brion y Resibois, 1994; Fonseca y Soriano, 1995; Mikkonen y col., 1997), con presencia de neuritas distróficas inmunopositivas para CR (Brion y Resibois, 1994). Estos datos coinciden con lo que sucede en nuestro modelo de Alzheimer y durante el envejecimiento normal.

Las células CR-positivas de la corteza realizan tanto sinapsis excitadoras como inhibitoras sobre neuronas piramidales e interneuronas (Del Rio y DeFelipe, 1997). Las CaBP como la CR son capaces de promover resistencia a la neurodegeneración al tamponar las concentraciones de calcio intracelulares, por lo que esta característica podría determinar la menor vulnerabilidad de las neuronas CR-positivas frente a las interneuronas que expresan SOM/NPY. La neurodegeneración específica de las neuronas CR-positivas, aunque no tan abundante como en el caso de SOM/NPY, puede tener importantes consecuencias patofisiológicas en el balance de inhibición/excitación que se produce tanto en el circuito local en la corteza entorrinal como en las proyecciones que se emiten desde la

corteza entorrinal hacia el hipocampo, afectando a los procesos de memoria y aprendizaje. Por lo tanto, la presencia de CaBP en las células no garantiza su resistencia frente a los procesos neurodegenerativos (Sampson y col., 1997).

4.1.3. Las interneuronas que expresan PV son resistentes al proceso neurodegenerativo

Las CaBP se consideran proteínas capaces de tamponar y transportar calcio, así como de regular varios sistemas enzimáticos. Debido a que los procesos neurodegenerativos están acompañados de fallos en la homeostasis del calcio, se ha postulado el posible papel protector de las CaBP en determinadas subpoblaciones neuronales en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Heizmann y Braun, 1992).

Las neuronas que expresan PV en la corteza entorrinal son todas de naturaleza GABAérgica (Tuñón y col., 1992; Wouterlood y col., 1995). Las neuronas de proyección de las capas II y III de la corteza entorrinal que inervan el hipocampo reciben sinapsis PV-positivas en el soma y el cono axónico, lo que genera una fuerte inhibición perisomática y en la región de disparo del potencial de acción, condicionando la información que llega hasta la formación hipocampal (Wouterlood y col., 1995).

A diferencia de las interneuronas que expresan SOM, las interneuronas perisomáticas de circuito local PV-positivas no se ven afectadas en la corteza entorrinal lateral, al igual que ocurre en el hipocampo (Ramos y col., 2006), incluso a edades tardías de 18 meses de edad en nuestros animales transgénicos PS1xAPP. Además, no se han observado neuritas distróficas inmunopositivas para esta CaBP a ninguna de las edades analizadas. Esta población es también resistente a la neurodegeneración durante el proceso normal de envejecimiento, como se ha demostrado en el hipocampo de rata (Vela y col., 2003). La baja vulnerabilidad de las neuronas PV-positivas a la neurodegeneración también se produce en los pacientes de Alzheimer, tanto en la corteza temporal, prefrontal como visual (Ferrer y col., 1991; Hof y col., 1991; Sampson y col., 1997; Leuba y col., 1998) cuyos somas y arborizaciones dendríticas se mantienen intactos.

Las células en candelabro, uno de los tipos de interneuronas que expresan PV, están consideradas como una de las subpoblaciones de neuronas GABAérgicas con mayor capacidad inhibitoria sobre las células principales. La pérdida de las neuronas en candelabro PV-positivas en el lóbulo temporal está relacionada con el desarrollo de la epilepsia (DeFelipe, 1999). Las células en candelabro son una fuente de inhibición de los segmentos iniciales axónicos de las neuronas principales y esta región se considera una zona estratégicamente importante en el control de la excitabilidad de estas neuronas y, por lo tanto, en el desarrollo de los síntomas epilépticos. La ausencia de neurodegeneración en la población de neuronas PV-positivas podría explicar la carencia de síntomas epilépticos en nuestro modelo animal.

Las sinapsis glutamatérgicas que reciben las interneuronas median su acción a través de dos tipos de receptores permeables al calcio, los AMPA y los NMDA. Las células

FS (*fast spiking*) son las células en cesto grandes y las células en candelabro. Ambos tipos neuronales expresan PV (Kawaguchi y Kubota, 1993), mientras que las células que poseen un disparo regular (*regular spiking nonpyramidal* o RSNP) suelen contener SOM. El grupo de células FS suelen presentar en su superficie receptores NMDA (Cauli y col., 2000). Aunque las interneuronas SOM presentan una cantidad similar de receptores NMDA en su superficie que las neuronas PV-positivas, sin embargo, la proporción de las distintas subunidades de receptores NMDA (NR2A, NR2B, NR2C, NR2D) difiere entre ambos grupos. Las neuronas que expresan SOM (células RSNP-SS) presentan siempre la subunidad NR2B, mientras que ésta es menos frecuente en las células FS. Por otro lado, las neuronas PV-positivas suelen expresar la subunidad NR2A y ésta es bastante menos frecuente en las RSNP-SS (Cauli y col., 2000). Por lo tanto, es posible que esta diferencia en la distribución de las subunidades de los receptores NMDA que posee cada tipo celular les haga presentar una vulnerabilidad diferencial frente a la neurodegeneración, además de la capacidad de la PV de tamponar los niveles de calcio intracelulares, contribuyendo al mantenimiento de las propiedades sinápticas.

Los receptores NMDA son igualmente abundantes en las células que contienen SOM y PV en la neocorteza (Cauli y col., 2000), mientras que en el hipocampo son las interneuronas SOM-positivas las que contienen una mayor cantidad de estos receptores en comparación con las interneuronas que expresan PV (Nyiri y col., 2003). Es posible que la corteza entorrinal, al tratarse de una zona de transición entre la allocorteza y la neocorteza, las interneuronas SOM-positivas contengan una proporción de receptores NMDA significativamente más alta que las neuronas PV-positivas, lo que podría explicar la vulnerabilidad diferencial frente al proceso neurodegenerativo.

4.2. Neurodegeneración temprana de células principales en las capas profundas de la corteza entorrinal del modelo PS1xAPP

4.2.1. Las neuronas principales de las capas profundas son vulnerables en las fases iniciales de la patología amiloide

Mientras que las células piramidales del hipocampo no están afectadas hasta edades muy avanzadas (17 meses de edad) en nuestro modelo PS1xAPP (Schmitz y col., 2004; Jimenez y col., 2008), el presente trabajo muestra la existencia de una reducción significativa (27%) en la densidad de neuronas principales de forma selectiva en las capas profundas de la corteza entorrinal lateral a la edad de 6 meses. Por lo tanto, la neurodegeneración de células principales ocurre en la corteza entorrinal mucho antes que en el hipocampo en el modelo PS1xAPP, a pesar de que ambas regiones se encuentran severamente afectadas por depósitos amiloides desde edades tempranas. El proceso neurodegenerativo en la corteza entorrinal humana es un evento que se produce en los estadios tempranos de la EA (Gomez-Isla y col., 1996; Price y col., 2001) y antes de que ocurra en el hipocampo. Por lo tanto, este animal transgénico PS1xAPP mimetiza, en cierto

modo, los estadios iniciales de esta patología, mostrando una vulnerabilidad neuronal específica con un patrón regional y temporal similar al que se produce en humanos.

La pérdida de neuronas principales se ha descrito en otros modelos animales de la EA, aunque a edades posteriores. Específicamente, el animal transgénico APP_{SL}PS1_{KI}, presenta una reducción del 50% de las neuronas piramidales en las regiones CA1/2 del hipocampo a los 10 meses de edad (Casas y col., 2004). En el modelo APP_STau_{VLW} existe una reducción del 19% de neuronas en la corteza entorrinal a los 9 meses de edad (Ribe y col., 2005). El transgénico 5xFAD también presenta una disminución neuronal en la corteza entorrinal y el subículo a los 9 meses de edad (Oakley y col., 2006) y una disminución neuronal en el hipocampo y la corteza a los 13 meses de edad en el modelo inducible APPxTau (Paulson y col., 2008). Sin embargo, no existen análisis cuantitativos de estos dos últimos estudios. Por lo tanto, nuestro animal transgénico PS1xAPP_{SL} es el que presenta un proceso neurodegenerativo más temprano y significativo de las neuronas principales de la corteza entorrinal (27% a los 6 meses), además de una pérdida selectiva de subpoblaciones de interneuronas a lo largo de la columna cortical a esta misma edad.

La pérdida de las neuronas principales ocurre de forma selectiva sólo en las capas profundas de la corteza entorrinal, mientras que no se detectaron cambios en las capas superficiales. Aunque la cuantificación estereológica no se ha realizado específicamente en cada una de las capas de la corteza entorrinal por separado, sí parece existir, desde un punto de vista cualitativo, una mayor pérdida neuronal en la capa V en comparación con la capa VI. La afectación preferente de la capa V también se ha observado en los animales 5xFAD (Oakley y col., 2006), aunque los autores no han documentado de forma cuantitativa esta pérdida. Además, en los pacientes de la EA también existe una vulnerabilidad selectiva por capas, siendo las neuronas de capa II de la corteza entorrinal, fundamentalmente, las que se ven más afectadas por el proceso neurodegenerativo (Hyman y col., 1984; Price y col., 2001; Lippa y col., 1992; Vermersch y col., 1992; Morys y col., 1994; Gomez Isla y col., 1996; Sobreviola y col., 1997; Kordower y col., 2001; Hof y col., 2003). En general, la patología de los pacientes de Alzheimer se desarrolla con una susceptibilidad diferencial en las diferentes regiones cerebrales. Los estudios neuropatológicos revelan una gran pérdida de neuronas piramidales en las capas III y V de las áreas de asociación (Brun y Englund, 1981; Thompson y col., 2003). Por lo tanto, la muerte de neuronas principales corticales en pacientes de Alzheimer no es un fenómeno generalizado en la columna cortical, sino que ocurre preferentemente en algunas capas pero no en otras. Estos resultados indican que, al igual que las interneuronas, las células principales muestran una vulnerabilidad diferencial en esta patología.

La gran mayoría de las neuronas principales de capas superficiales, sobre todo las de capa II, expresan la glucoproteína reelina. La densidad de neuronas reelina-positivas no se ve afectada en los animales PS1xAPP en comparación con los controles, por lo que estos datos, junto con el análisis cualitativo de la inmunohistoquímica con NeuN, apoyan los resultados de que las neuronas principales de las capas superficiales de la corteza entorrinal no son tan vulnerables a la neurodegeneración como las de las capas profundas. Además, el notable descenso de inmunorreactividad para FAIM_L en las capas profundas, pero no en

las superficiales, de la corteza entorrinal a los 6 meses de edad, acompañado de una disminución significativa de los niveles de este factor pro-supervivencia, así como la presencia de inmunomarcaje para Bim y caspasa 3 activada en estas capas infragranulares, refuerzan la existencia de un proceso neurodegenerativo selectivo de las capas profundas de la corteza entorrinal a edades tempranas en los animales PS1xAPP.

Esta pérdida neuronal temprana en la corteza entorrinal no se correlaciona con una reducción del volumen de esta región cortical en nuestro modelo PS1xAPP, probablemente debido a que los depósitos amiloides, bastante abundantes a la edad de 6 meses, compensan el volumen de la pérdida neuronal.

La presencia de neuritas distróficas positivas para APP desde edades muy tempranas (4 meses) demuestra la existencia de una patología axonal y/o dendrítica en neuronas principales, ya que son éstas las que sobre-expresan el transgén humano mutado de la APP. La presencia de inmunomarcaje con AT8 en las neuritas distróficas confirma la existencia de fallos a nivel de transporte axonal y sináptico, así como la presencia de inmunorreactividad alrededor de las placas amiloides con los marcadores sinápticos empleados. Las alteraciones en el citoesqueleto neuronal en la EA puede afectar al aparato de Golgi, provocando fallos en el procesamiento proteico, además de dañar el transporte axonal y producirse una pérdida sináptica, lo que puede repercutir en la supervivencia de las neuronas (Terry, 1996; Stokin y Goldstein, 2006) como también se ha descrito en modelos animales de la EA (Wirhys y col., 2006; Lazarov y col., 2007). De hecho, la existencia de fallos sinápticos es una de las características de las fases iniciales del Alzheimer (Selkoe, 2002).

Una posible explicación de la vulnerabilidad selectiva de las neuronas principales de las capas profundas en la corteza entorrinal, así como de las interneuronas, es que éstas no sobre-expresan hAPP, o lo hacen en muy pequeña proporción. Se sabe que la forma soluble del APP posee una potente acción neuroprotectora, porque provoca una reducción rápida y prolongada de la concentración de calcio intracelular, además de proteger a las neuronas contra la neurotoxicidad del glutamato en células en cultivo (Mattson y col., 1993). Por lo tanto, las neuronas que sufren un proceso neurodegenerativo específico podrían carecer del entorno neuroprotector que genera el sAPP en comparación con las neuronas que sobre-expresan APP, como son las neuronas principales, excepto las de capa V. Los posibles factores inductores de la muerte neuronal en nuestro modelo se discuten más adelante.

En resumen, los resultados del presente trabajo en un modelo *in vivo* de EA ponen de manifiesto la naturaleza heterogénea de esta patología tanto a nivel regional (la corteza entorrinal es la región cortical más vulnerable a edades tempranas y la muerte neuronal es dependiente de lámina) como a nivel celular (existe vulnerabilidad selectiva de tipos neuronales).

4.2.2. Consecuencias de la pérdida neuronal en los procesos de memoria y aprendizaje en la corteza entorrinal

Las estructuras del lóbulo temporal medial, incluyendo el hipocampo, la corteza entorrinal, la corteza perirrinal y la corteza parahipocampal, juegan un papel muy importante en el proceso de memoria de objetos y lugares. Las conexiones recíprocas que mantienen con la neocorteza son necesarias para el establecimiento de la memoria a largo plazo de hechos y eventos (memoria declarativa). Sin embargo, el papel de estas estructuras cerebrales en la memoria es temporal, ya que con el paso del tiempo la memoria se almacena en la neocorteza gradualmente y llega a ser independiente de las estructuras del lóbulo temporal (Squire y Zola Morgan, 1991).

Los daños o lesiones provocadas experimentalmente en una determinada área cerebral se utilizan como modelo de la pérdida de conexiones patológicas bien por fallos sinápticos, axonales o por una pérdida masiva de neuronas de proyección que conectan dos regiones. En este sentido, las lesiones en el lóbulo temporal medial producen fallos en la memoria, tanto en la memoria visual de objetos (Zola-Morgan y Squire, 1985), la memoria táctil (Suzuki y col., 1993) como en la memoria de la localización espacial de objetos (Suzuki y col., 1997). Las lesiones limitadas a la corteza entorrinal provocan fallos moderados de memoria. Si además se lesiona la corteza perirrinal, los daños se agravan significativamente en comparación con únicamente una lesión perirrinal (Meunier y col., 1993).

Por otro lado, se ha determinado que puede existir déficit de memoria en animales de edad avanzada sin que exista pérdida de las neuronas de proyección de capa II de la corteza entorrinal (Gazzaley y col., 1997), aunque en la EA los problemas de memoria suelen ir asociados a alteraciones en las neuronas de proyección que forman la vía perforante (Hyman y col., 1986).

Los cambios neuropatológicos y la pérdida neuronal en la corteza entorrinal pueden contribuir a fallos en la memoria en estadios muy tempranos de la EA. Sin embargo, parece existir un umbral de muerte neuronal en el área entorrinal y alteraciones en otras estructuras relacionadas con la memoria que se ha de alcanzar para que los fallos de memoria lleguen a ser detectables clínicamente (Gomez-Isla y col., 1996). Aunque en nuestro trabajo no hemos realizado estudios conductuales en el modelo PS1xAPP que correlacionen la pérdida neuronal temprana en la corteza entorrinal con fallos en la memoria, sí tenemos información de que existen fallos cognitivos tempranos en este modelo transgénico (datos no publicados).

4.3. El β -amiloide extracelular, y no el intracelular, induce el proceso neurodegenerativo temprano de la corteza entorrinal

La(s) causa(s) que provoca(n) la muerte neuronal en la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP, tanto de las neuronas piramidales como en las interneuronas que contienen SOM, NPY o CR, aún no se conocen, aunque se ha sugerido en múltiples

estudios que el principal agente causal de los procesos neurodegenerativos que se dan en la patogenia de la EA es la toxicidad del péptido A β (ver LaFerla y col., 2007).

4.3.1. La muerte de neuronas de la corteza entorrinal en fases tempranas de la patología amiloidea no es inducida por acumulación de β -amiloide intracelular

El A β que se ha descrito en el interior neuronal en casos de EA, principalmente corresponde a la forma A β_{42} (Gouras y col., 2000). Los pacientes con fallos cognitivos moderados presentan inmunomarcaje intracelular de A β_{42} específicamente en las regiones cerebrales que se ven más afectadas por la patología amiloidea, como el hipocampo y la corteza entorrinal, por lo que se piensa que la acumulación intraneuronal de A β es un evento temprano de la progresión de la EA y que precede a la formación de depósitos extracelulares de A β (ver revisión LaFerla, 2007). La acumulación del A β intraneuronal no parece correlacionarse ni con la formación de placas extracelulares ni con la formación de NFTs (Wegiel y col., 2007), lo que no quiere decir que no posea efectos neuropatológicos, ya que su presencia en cuerpos multivesiculares (endosomas tardíos) podría generar fallos tras inhibir el sistema ubiquitina-proteasoma lo que, a su vez, reduciría la capacidad de degradar A β .

Existen algunos estudios que correlacionan la acumulación temprana de A β intracelular con la disfunción o muerte neuronal en varios modelos *in vivo* de Alzheimer (Oddo y col., 2003; Casas y col., 2004; Wirths y col., 2004; Billings y col., 2005; Oakley y col., 2006). Además, recientemente, se ha descrito que las neuronas que acumulan desde edades tempranas A β intracelular son las que preferentemente desaparecen en la corteza prefrontal del animal APP_{SL}PS1_{KI} a los 6 meses de edad (Christensen y col., 2008). En nuestro modelo, el marcaje inmunohistoquímico intracelular con 6E10 en la corteza entorrinal, se localiza en células principales a los 2 meses de edad, incluso antes de la aparición de las placas extracelulares (ver también Oddo y col., 2003; Wirths y col., 2001; Wirths y col., 2004; Oakley y col., 2006). Sin embargo, las neuronas principales de las capas II y III, cuyos somas presentan una intensa inmunorreactividad intracelular para este anticuerpo, no muestran cambios neurodegenerativos. Por el contrario, en capa V, donde existe muerte de neuronas principales a los 6 meses, apenas se observan somas inmunorreactivos para este anticuerpo, ni siquiera a los 2 meses de edad, mucho antes de que mueran estas neuronas.

Teniendo en cuenta que el anticuerpo 6E10 reconoce los 17 primeros aminoácidos de la secuencia del A β , este anticuerpo podría estar en realidad poniendo de manifiesto productos de la proteólisis del APP e, incluso, el APP sin procesar. Por lo tanto, la marca intracelular para 6E10 en neuronas principales de capas II y III que observamos en nuestro modelo transgénico podría deberse al reconocimiento del APP y sus derivados y, en menor medida, al A β .

Además de la ausencia de acumulación de A β en las neuronas de capa V (inmunonegativas para 6E10), estas neuronas no expresan hAPP. Las interneuronas tampoco expresan el transgén hAPP y carecen de inmunomarcaje para 6E10, como también

se ha demostrado en el hipocampo de este modelo (Ramos y col., 2006). Por lo tanto, la vulnerabilidad de estas dos poblaciones neuronales en nuestro modelo animal no es debida a la acumulación de A β intracelular.

Para confirmar esta hipótesis, hemos empleado anticuerpos específicos para las formas A β_{40} y A β_{42} en secciones pretratadas con ácido fórmico de animales de 2, 4 y 6 meses de edad. En ningún caso hemos encontrado inmunorreactividad intracelular para A β en la corteza entorrinal. Sin embargo, sí existe un intenso marcaje intraneuronal en la capa V de la corteza motora y en el subículo a la edad de 2 meses. Es más, la acumulación de A β intracelular en la capa V de corteza motora no induce muerte temprana de estas células, al menos a los 6 meses de edad, como ha demostrado el recuento estereológico de esta población en comparación con los animales control. Por último, no hemos detectado tinción intracelular para Tioflavina-S en la corteza entorrinal, por lo que estas células no contenían A β fibrilar dentro de los somas, al menos en estadios tempranos, aunque no podemos descartar la presencia de especies de A β oligomérico prefibrilar.

En conclusión, el A β no se acumula de forma intracelular en las neuronas de la corteza entorrinal de nuestro modelo animal y, por lo tanto, no es el mecanismo causante del proceso neurodegenerativo temprano. Este trabajo, por consiguiente, cuestiona de algún modo la corriente actual que apoya la acumulación intracelular como el principal agente inductor de la muerte neuronal en el Alzheimer. Evidentemente, aunque en algunos modelos se ha descrito la acumulación intracelular de A β a edades tempranas, la muerte neuronal acontecía a edades muy avanzadas (Billings y col., 2005; Christensen y col., 2008). Por lo tanto, la neurotoxicidad de este proceso no parece estar muy justificada. Otra posibilidad es que, en realidad, no se trate de A β , sino de formas de APP reconocidas por el anticuerpo utilizado, ya que, como hemos visto, algunos anticuerpos empleados para el reconocimiento de A β son capaces de reconocer también la proteína precursora APP, así como algunas formas procesadas de APP que no son A β .

En humanos, se ha descrito la presencia de A β intracelular. Las familias que tienen una duplicación del gen de la APP presentan una gran cantidad de A β_{40} intracelular (Cabrejo y col., 2006), mientras que varios estudios muestran que los pacientes de EA presentan A β_{42} intracelular (Gouras y col., 2000; Mochizuki y col., 2000; D'Andrea y col., 2001 y 2002). Además, los pacientes de síndrome de Down muestran A β intracelular en neuronas hipocámpales y corticales (Mori y col., 2002). Se ha demostrado que el A β puede afectar a la actividad sináptica, provocar la disfunción del proteasoma, desequilibrar la homeostasis del calcio e, incluso, facilitar la hiperfosforilación de tau (ver revisión LaFerla, 2007). Sin embargo, aún no se conoce qué tipo de agregación es la mayoritaria del A β intracelular y cuál es la que provoca fallos en la plasticidad sináptica, la memoria y el aprendizaje ni qué tipo es el que se correlaciona con la patología y el declive cognitivo. Por lo tanto, hasta que estas cuestiones no sean aclaradas, no se puede afirmar que el A β intracelular sea el principal agente causal de la neurodegeneración y, por consiguiente, es posible que existan otros factores que intervengan en el proceso neurodegenerativo, sobre todo teniendo en cuenta que en nuestro modelo PS1xAPP las neuronas que poseen A β intracelular, como son las neuronas de capa V de la corteza motora, no sufren un proceso neurodegenerativo.

Además, la muerte neuronal se produce a edades mucho más avanzadas que los primeros signos de A β intracelular, tanto en modelos animales como en pacientes de la EA, lo que hace que sea discutible el papel neurotóxico de este A β intracelular, si es que realmente se trata de A β .

4.3.2. La formación de depósitos de β -amiloide tiene lugar, preferentemente, en las capas profundas de la corteza entorrinal, proceso que se correlaciona con la conectividad de esta región cerebral y la liberación sináptica del β -amiloide

Es de destacar que la muerte de las neuronas principales de las capas profundas de la corteza entorrinal del animal transgénico PS1xAPP se correlaciona estrechamente con la formación de depósitos de A β , preferentemente, en estas capas de la columna cortical. Aproximadamente, el 75% de los depósitos extracelulares de A β en esta región se encuentran en las capas profundas. Comienzan a detectarse entre los 2 y los 4 meses de edad y aumentan, en número y tamaño, de forma considerable a los 6 meses. Nuestro estudio cuantitativo de carga amiloide con TS demostró que la formación de las placas amiloides (carga amiloide) estaba significativamente incrementada en las capas V y VI en comparación con las capas superficiales (3,8% en las profundas vs. 0,9% en las superficiales a los 6 meses de edad). La formación preferente de depósitos extracelulares en estas capas, posiblemente, comprometa la supervivencia de las neuronas principales, aunque no podemos excluir la existencia de otras causas que generen una vulnerabilidad selectiva en las capas profundas de la corteza entorrinal.

Hoy en día no conocemos la naturaleza de las especies de A β que están implicadas en la muerte neuronal. Sin embargo, se ha propuesto que los oligómeros solubles de A β sean las principales especies tóxicas amiloides (Lambert y col., 1998; De Felice y col., 2004; Haass y Selkoe, 2007). En este sentido, se ha sugerido que las placas son la principal fuente de A β oligomérico soluble con características tóxicas (Martins y col., 2008). La formación de A β fibrilar se produce a partir del A β monomérico que pasa a un estado intermediario protofibrilar tóxico (oligomérico soluble), madurando hacia una forma inerte, las fibras amiloides que forman parte de las placas extracelulares. Se cree que los lípidos son capaces de desestabilizar y resolubilizar rápidamente estas fibras de A β maduras, aunque no hacia formas monoméricas, sino hacia protofibrillas amiloides solubles. Estas protofibrillas solubles son muy similares a las que se forman por oligomerización de los monómeros de A β , con características tóxicas, capaces de difundir rápidamente hasta las áreas cerebrales más comprometidas en el Alzheimer y, consecuentemente, de provocar procesos neurodegenerativos, además de déficit de memoria e hiperfosforilación de tau (Martins y col., 2008). Por lo tanto, las placas extracelulares de A β son una fuente potencial de agregados tóxicos de A β que pueden ser activadas por la exposición a lípidos, cuyo metabolismo se modifica con la edad. Esta idea es muy interesante, ya que podría explicar porqué no suele existir una correlación entre la densidad de placas amiloides y los fallos cognitivos en los pacientes de Alzheimer. Finalmente, también podría explicar la correlación

que obtenemos en nuestro modelo *in vivo* en las capas profundas de la corteza entorrinal entre la neurodegeneración y la predominancia de placas amiloides en estas capas.

De esta manera, se podría especular que la acumulación de las placas de A β en las capas profundas podría incrementar de forma local la concentración de A β oligomérico y, en consecuencia, afectar a la mayoría de las poblaciones neuronales que son vulnerables. Además de A β oligomérico, las formas fibrilares del A β también son tóxicas para las neuronas. Los agregados fibrilares de A β , positivos para TS, y no las formas monoméricas, son tóxicas tanto para las neuronas en cultivo (Busciglio y col., 1993; Pike y col., 1993; Yankner, 1996) como *in vivo*, tanto en la EA como en modelos animales. Se ha demostrado que el A β fibrilar es capaz de afectar a la homeostasis del calcio, promover la formación de radicales libres y el daño oxidativo, potenciando la apoptosis y la excitotoxicidad (Urbanc y col., 2002). Por lo tanto, la existencia de grandes depósitos de A β extracelular en las capas profundas de la corteza entorrinal está directamente correlacionada con la muerte celular en estas capas, ya sea a través de la toxicidad del A β fibrilar o de las formas oligoméricas, que son las formas intermediarias del equilibrio que existe entre la formación y eliminación de las placas de A β . Desafortunadamente, las razones que determinan la vulnerabilidad específica de determinados tipos neuronales frente a estas formas aún no se conocen.

Este patrón específico de depósito amiloide en las capas profundas concuerda con las conexiones de la corteza entorrinal y la liberación sináptica del A β a través de las proyecciones axonales. De hecho, lesiones de axones corticales que proyectan al giro dentado, producidas en animales transgénicos APP, reducen sustancialmente la acumulación extracelular de A β en esta región hipocampal (Lazarov y col., 2002; Sheng y col., 2002). Por otro lado, lesiones de la corteza entorrinal que afectan a la vía perforante, en animales transgénicos AP/PS, provocan una disminución de los depósitos de A β difusibles en los campos terminales de esta vía (CA1 y subículo) (Van Groen y col., 2003b). Todo esto indica que el transporte axonal de APP y/o de A β y su secreción en los terminales sinápticos juegan un papel muy importante en la deposición extracelular que acontece en la EA. Por otro lado, se conoce que la actividad sináptica y, concretamente, la exocitosis de vesículas sinápticas está relacionada con la liberación neuronal de A β (Cirrito y col., 2005; Cirrito y col., 2008).

En la corteza entorrinal, las proyecciones que reciben las capas profundas parten principalmente desde CA1 y el subículo (ver revisión Canto y col., 2008). Las células principales de estas dos regiones hipocampales presentan inmunomarcaje con el anticuerpo 6E10 y APP desde los 2 meses de edad (Ramos y col., 2006; Baglietto-Vargas, 2008). Esto podría explicar el desarrollo masivo de placas de A β en las capas profundas de la corteza entorrinal a edades tempranas (un 75% de la carga total de A β a los 6 meses de edad). Además, las capas superficiales de la corteza entorrinal (II y III) reciben su principal inervación desde áreas como las capas profundas de la corteza entorrinal, la amígdala, el parasubículo o el presubículo (ver revisión Canto y col., 2008), que son regiones que presentan bajos niveles de 6E10 intracelular a edades tempranas en nuestro modelo (datos propios no publicados), lo que explicaría la acumulación extracelular limitada de A β en las capas superficiales de la corteza entorrinal (sólo un 25% de la carga total de A β a los 6

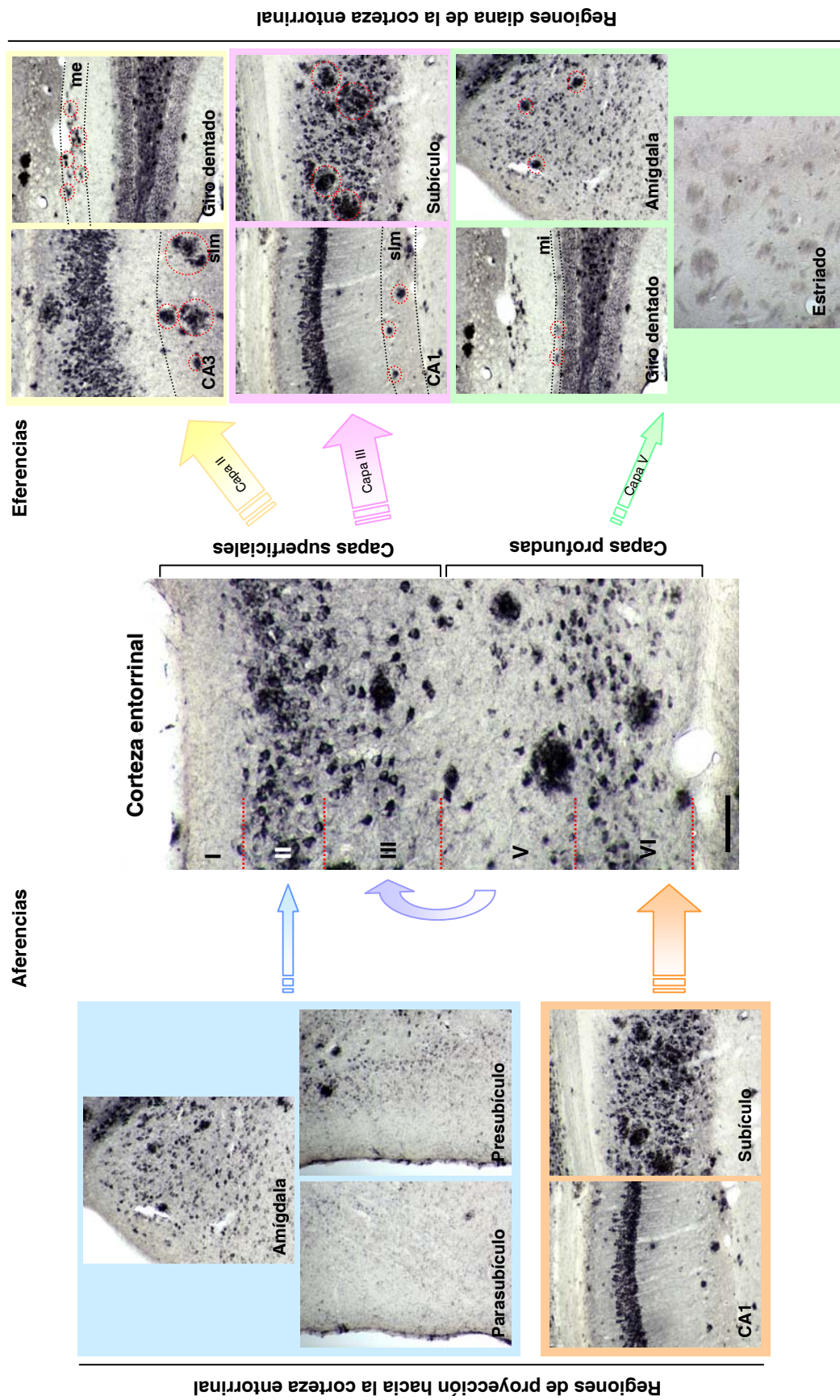


Figura 4.2. Correlación entre la conectividad entorrinal (aferencias y eferencias) y la formación de placas de β -amiloides (círculos) en las capas superficiales y profundas concuerda con las conexiones de la CE y la liberación sináptica de $A\beta$. Las regiones que proyectan a las capas superficiales contienen escaso $A\beta$ intracelular, mientras que las regiones que proyectan a las capas profundas contienen abundante marcaje amiloide intracelular. Esta misma correlación se observa en las eferencias de la CE. Secciones coronales inmunomarcadas con 6E10. El grosor de las flechas muestra la densidad de las proyecciones. slm: estrato lagunoso molecular; me: capa molecular externa; mi: capa molecular interna. Barra de escala: 100 μ m.

meses de edad), ya que el transporte de A β y/o APP a través de los axones es muy escaso (ver Fig. 4.2).

Por otro lado, existe una gran concordancia entre las eferencias entorrinales y la formación de depósitos amiloides en las regiones diana de estas proyecciones. De este modo, las capas superficiales de la corteza entorrinal conectan con las áreas CA3 y giro dentado (proyecciones de la capa II) y CA1 y subículo (proyecciones de la capa III) del hipocampo, a través de la vía perforante (Van Groen, 2003a). El marcaje intenso con 6E10 de las neuronas de capas II y III de la corteza entorrinal se correlaciona con la gran carga amiloide que aparece a edades tempranas en estas áreas del hipocampo. Del mismo modo, el escaso número de neuronas de capa V marcadas con 6E10 intraneuronalmente también se relaciona con la escasa presencia o ausencia de depósitos de A β en las regiones donde llegan las proyecciones de las neuronas de capa V de la corteza entorrinal, como la amígdala y el estriado (datos propios no publicados) (ver Fig. 4.2).

Por lo tanto, en nuestro modelo PS1xAPP, la pérdida de las neuronas principales de las capas profundas de la corteza entorrinal se correlaciona con la acumulación temprana y específica de los depósitos extracelulares de A β en estas capas, muy posiblemente a partir del A β liberado a nivel sináptico por las aferencias que reciben estas capas. El hecho de que la formación de las placas en capas profundas ocurra de forma más abundante entre los 4 y 6 meses de edad, periodo durante el cual tiene lugar la muerte neuronal temprana, apoya también la hipótesis de que el A β es el agente inductor (directa o indirectamente) de la neurodegeneración. Esta correlación entre la muerte celular y la deposición extracelular de A β se ha observado en otros modelos de la EA, como en el transgénico PSAPP, en el que existe una relación espacial entre la deposición de placas, la activación astrocitaria y microglial y la muerte neuronal. En dicho modelo, la pérdida neuronal únicamente se da en las zonas donde existe depósito de amiloide, ya sea por daño neurotóxico o, simplemente, por la presencia física de una proteína extraña (Howlett y col., 2008).

Si el A β extracelular ejerce un efecto directo y/o indirecto, a través de una respuesta inflamatoria, aun no está esclarecido. De cualquier forma, la placas o el A β oligomérico liberado a partir de ellas, pueden contribuir significativamente al proceso neurodegenerativo.

Por su parte, las interneuronas no sobre-expresan hAPP (Ramos y col., 2006), por lo que la muerte selectiva de las neuronas que expresan SOM, NPY y/o CR no está asociada con la formación y/o acumulación de A β intracelular. Por este motivo, el A β extracelular también podría ser el agente causal de su neurodegeneración. La pérdida de las neuronas SOM/NPY-positivas se produce de forma homogénea tanto en las capas superficiales como en las profundas de la corteza entorrinal, lo que podría indicar la existencia de otros factores como agentes causantes de su neurodegeneración más que la acumulación de depósitos extracelulares, aunque sí podría ser una explicación para la muerte específica en las capas profundas de las neuronas que expresan CR.

4.4. La respuesta inflamatoria citotóxica es, posiblemente, junto al β -amiloide extracelular, responsable de la neurodegeneración temprana en la corteza entorrinal

Los procesos neuroinflamatorios están estrechamente ligados a diversas enfermedades neurodegenerativas, tales como la esclerosis lateral amiotrófica, la esclerosis múltiple, el Parkinson y, por supuesto, el Alzheimer. La activación tanto de la astrogliá como de la microgliá asociada al desarrollo de la EA es un hecho conocido desde hace relativamente bastante tiempo. Sin embargo, el papel perjudicial y/o beneficioso que juegan en esta patología no son conocidos por el momento (Griffin y col., 1998; Akiyama y col., 2000; McGeer y McGeer, 2001; Dudal y col., 2004; Craft y col., 2006; Sastre y col., 2006; Wyss-Coray, 2006; Heneka and O' Banion, 2007).

4.4.1. La deposición de β -amiloide extracelular induce una activación glial potencialmente citotóxica desde edades tempranas en la corteza entorrinal

Las placas de A β inducen un proceso neuroinflamatorio que puede contribuir de forma sustancial al proceso neurodegenerativo mediante la liberación de agentes citotóxicos, como pueden ser citoquinas inflamatorias, aminoácidos excitadores y especies reactivas de oxígenos, entre otros (Itagaki y col., 1989; Hu y col., 1998; Johnstone y col., 1999; Apelt y Schliebs, 2001; Mrak y Griffin, 2005; Craft y col., 2006; Ralay Ranaivo y col., 2006; Zipp y Aktas, 2006). Recientemente, nuestro grupo de investigación ha descrito la existencia de un proceso inflamatorio temprano asociado temporal y físicamente a las placas de A β en el hipocampo de nuestro modelo PS1xAPP (Jimenez y col., 2008). En la corteza entorrinal existe también activación glial (microgliá y astrogliá) asociada a la deposición temprana de A β . A los 4-6 meses de edad, la microgliá activada, que se diferencia morfológicamente por ser hipertrófica con procesos cortos y engrosados, se encuentra rodeando e infiltrando las placas amiloides, al igual que ocurre en el hipocampo de este modelo (Jimenez y col., 2008) y en los pacientes de Alzheimer (Simard y col., 2006; Heneka y O'Banion, 2007). A diferencia del hipocampo, en la corteza entorrinal se ha observado la presencia de microgliá activada también en las zonas de interplaca a los 4-6 meses de edad, fundamentalmente en las capas profundas, donde abundan las placas. Por lo tanto, la activación microglial en la corteza entorrinal se encuentra expandida a las regiones interplaca desde edades tempranas, mientras que en el hipocampo esta situación no se da hasta edades mucho más avanzadas (18 meses de edad). Por otro lado, existe también numerosos astrocitos reactivos a lo largo de la columna cortical, algunos de ellos rodean también las placas, al igual que ocurre en el hipocampo.

Los factores que inducen la activación glial en la corteza entorrinal de este modelo no son conocidos. Sin embargo, se sabe que el A β fibrilar es capaz de activar una señal tirosín quinasa en cultivos primarios de microgliá murina y monocitos humanos que provoca la producción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF α e IL1 β) y ROS (Combs y col., 2001). La microgliá, derivada de monocitos circulantes y reclutada desde los vasos sanguíneos

locales, migra rápidamente y se concentra alrededor de las placas neuríticas, en donde parecen facilitar la conversión del A β oligomérico soluble a formas fibrilares (Nagele y col., 2004) y la internalización y eliminación de A β de las placas (Simard y col., 2006). Estudios recientes *in vivo*, demuestran que las placas amiloides extracelulares recién formadas son capaces de reclutar y activar a las células microgliales. Esta estrecha relación temporal entre la formación de placas y la activación y reclutamiento de la microglía ha sido observada *in vivo* mediante el empleo del microscopio multifotón (Meyer-Luehmann y col., 2008). Aunque no ha sido determinado en estos estudios que la microglía elimine A β de la placa, su presencia sí parece limitar el diámetro de la placa, restringiendo su crecimiento.

Las células microgliales activadas pueden tener funciones beneficiosas (diferenciación alternativa), como frenar la formación de placas mediante fagocitosis y la liberación de factores neurotróficos o, por el contrario, estas células pueden ejercer acciones perjudiciales (diferenciación clásica), incrementando la patología al causar daño neuronal mediante la liberación de factores citotóxicos (Jimenez y col., 2008; El Khoury y Luster, 2008; Farfara y col., 2008). En la corteza entorrinal de nuestro modelo PS1xAPP, la respuesta inflamatoria temprana (4-6 meses) presenta un perfil potencialmente citotóxico, en el que la microglía interplaca activada expresa TNF α y la astrogía reactiva iNOS. Además, existe un aumento significativo de los niveles de ARNm para TRAIL, DR5, FasL y TNFR1, lo que apoya la idea de un ambiente preferentemente tóxico desde fases muy tempranas de la patología amiloidea en esta región cerebral.

Por lo tanto, proponemos que esta reacción inflamatoria temprana puede estar implicada en la neurodegeneración entorrinal observada a estas edades en nuestro modelo de EA. La glía activada abunda en capas profundas, donde tiene lugar la muerte de neuronas principales, pudiendo tener, por lo tanto, un papel importante como agente inductor de la neurodegeneración de células principales, así como de las interneuronas SOM/NPY y CR positivas localizadas en capas profundas. Sin embargo, también se observa inmunorreactividad para TNF α en capas superficiales (probablemente debido a la difusión del TNF α soluble) y un aumento de la astrogía iNOS-positiva hacia capas superficiales con la edad, hecho que podría explicar la muerte de interneuronas SOM/NPY positivas en las capas superficiales. De hecho, se ha descrito que en el hipocampo de ratas viejas, así como de ratas tratadas con LPS, existe un incremento del ambiente pro-inflamatorio citotóxico con producción de TNF α , que provoca la neurodegeneración específica de las interneuronas SOM-positivas (Gavilán y col., 2007). Desconocemos porqué las neuronas principales de capas superficiales son resistentes a este ambiente citotóxico, mientras que las de capas profundas son altamente vulnerables. Un posible motivo resida en que las neuronas de capas profundas, además de estar bajo la influencia de un ambiente citotóxico glial, están sometidas a los posibles efectos tóxicos de las placas que están situadas preferentemente en estas capas, seguramente debido a la liberación de A β oligomérico soluble.

La microglía puede presentar distintos fenotipos (alternativo o clásico) a lo largo de la progresión de la enfermedad, que pueden alternarse en el tiempo o coexistir. De hecho, en la corteza entorrinal, la microglía activada que está en estrecha asociación con las placas son Ym1-positivas y TNF α negativas (fenotipo alternativo), mientras que la microglía

activada interplaca es Ym1-negativa y TNF α positiva (fenotipo clásico). Recientemente, nuestro grupo ha descrito un cambio fenotípico dependiente de la edad de las células microgliales en el hipocampo de nuestro modelo animal (Jimenez y col., 2008). En esta región cerebral, desde edades tempranas (4-6 meses), la microglía activada se localizó exclusivamente alrededor de las placas y mostró un fenotipo alternativo (expresión de Ym1) con un posible papel neuroprotector (expresión de IGF1 y actividad fagocítica). Esta diferenciación alternativa en fases tempranas explicaría la escasa muerte neuronal que tiene lugar en el hipocampo durante ese periodo. Sin embargo, a edades avanzadas (18 meses) la activación microglial estaba expandida a las regiones interplaca mostrando, en este caso, un fenotipo clásico (expresión de TNF α y factores relacionados). Esta activación clásica de carácter citotóxico coincide temporalmente con la muerte de neuronas piramidales (33%). Por lo tanto, en el hipocampo, la respuesta inflamatoria pasa de ser potencialmente neuroprotectora en fases tempranas de la patología amiloide, a mostrar un perfil citotóxico en las fases avanzadas. El aumento de los niveles de A β oligomérico soluble con la edad parece ser el agente inductor de este cambio fenotípico. Estudios *in vitro* del grupo han demostrado que es el A β oligomérico, y no el monomérico, el inductor de la diferenciación clásica microglial (Jimenez y col., 2008). Sin embargo, aún no sabemos si la activación clásica temprana que tiene lugar en la corteza entorrinal está inducida también por un aumento de los niveles extracelulares de A β oligomérico soluble.

Además del efecto inductor del A β oligomérico existen otros factores importantes que podrían modular el fenotipo microglial. Se sabe que el envejecimiento y/o el A β pueden disminuir la expresión neuronal de factores inhibidores de la activación microglial como CD200, fractalquina (mediador entre neuronas y microglía con funciones neuroprotectoras) o neurotransmisores, como la noradrenalina o la acetilcolina (Heneka y O'Banion, 2007). Además, las neuronas dañadas pueden liberar estimuladores de la activación microglial, como ATP, UDP o CCL21 (De Jong y col., 2005; Inoue y col., 2007). Por lo tanto, es posible que la activación glial clásica en nuestro modelo refleje un efecto sinérgico del A β actuando directamente sobre la microglía e indirectamente afectando a la comunicación existente entre las neuronas y la microglía (ver apartado 4.4.2).

Existen múltiples receptores microgliales que pueden unir A β y, por lo tanto, inducir la activación de estas células (ver Rogers y Lue, 2001). Entre ellos se encuentran receptores de superficie implicados en la respuesta quimioatrayente, como son los receptores FPR (del inglés *formil peptide receptor*), los receptores MSR (*macrophage scavenger receptor*) y los receptores RAGE (*receptor for advanced glycation endproducts*). La microglía también presentan en superficie receptores de citoquinas, quimioquinas y del complemento, así como de reconocimiento de patrón o TLRs (*toll like receptor*) y receptores purinérgicos (Hanisch y Kettenmann, 2007). La activación de los receptores TLR y el receptor purinérgico P2X7 promueve la transcripción de quimioquinas y citoquinas pro-inflamatorias, como la IL1 en el caso del receptor P2X7, cuya activación mediante A β es suficiente para provocar la activación microglial (Monif y col., 2009; Sanz y col., 2009). De hecho, cultivos gliales de ratones KO para P2X7R muestran una menor producción de IL1 β (Mingam y col., 2008).

Respecto a la expresión de receptores microgliales en nuestro modelo animal que pudieran inducir su diferenciación, resultados preliminares del grupo del Dr. Vitorica en el hipocampo han determinado un incremento en la expresión del receptor TLR2 a los 6 meses, mientras que a los 18 meses, existe una inducción de varios receptores como TLR2, TLR4, TLR9 y del receptor mFPR (forma metilada). Teniendo en cuenta el ambiente inflamatorio del hipocampo a los 18 meses es similar al de la corteza entorrinal a los 6 meses de edad, cabría esperar que en esta región cortical existiera una sobre expresión de diversos receptores TLRs, que habría que analizar en un futuro próximo, ya que los receptores TLR1, 2, 4 y 6 están implicados en la inducción de citoquinas pro-inflamatorias (Aravalli y col., 2007). Diseccionar a nivel molecular cuáles son las dianas específicas del A β para la diferenciación microglial alternativa o clásica podría ser de gran relevancia para el diseño de herramientas terapéuticas en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Por su parte, como en el hipocampo, la astrogliá de la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP presenta una morfología reactiva con expresión de iNOS, al igual que ocurre en el hipocampo y la corteza entorrinal de pacientes de Alzheimer (Heneka y col., 2001). Por lo tanto, los astrocitos reactivos podrían prolongar el proceso neuroinflamatorio, contribuyendo a la neurotoxicidad mediada por NO.

Por otro lado, la producción de NO por la astrogliá reactiva podría tener una doble finalidad, ya que se ha observado que la eliminación génica de iNOS en transgénicos para la EA (APP_S) genera un incremento de los niveles de A β soluble, incrementa el proceso neurodegenerativo y la hiperfosforilación patológica de tau (Colton y col., 2006b). Por lo tanto, no podemos descartar que la activación astrogliá, con producción de NO, también pudiera tener funciones beneficiosas (neuroprotectoras) como ocurre con la activación microglial.

En condiciones no patológicas, la astrogliá expresa de forma constitutiva nNOS, al igual que las neuronas, mientras que la producción de iNOS es inducida en condiciones pro-inflamatorias por la microglía, la astrogliá y las neuronas. Sin embargo, aún no se conocen bien los inductores de la activación astrogliá en la patología amiloide, aunque existe una gran probabilidad de que, como en el caso de la microglía, el A β sea un agente causal muy importante.

4.4.2. La diferenciación microglial afecta a la progresión patológica del Alzheimer y su modulación fenotípica abre futuras vías para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas

La microglía activada con fenotipo alternativo (anti-inflamatorio) puede tener funciones neuroprotectoras al desencadenar una respuesta beneficiosa, regeneración y supervivencia neuronal, liberando citoquinas anti-inflamatorias, factores de crecimiento neuronal, fagocitando y/o degradando A β extracelular (Streit, 2005; Butovsky y col., 2006). Se ha demostrado que la microglía, en presencia de IL4, puede producir factores de crecimiento como el IGF1 (Butovsky y col., 2006; Zhao y col., 2006). La IL4 es capaz de

reducir la toxicidad producida por A β tanto *in vitro* como *in vivo* (Butovsky y col., 2005 y 2006) e incrementa la fagocitosis del A β (Koenigsknecht-Talboo y Landreth, 2005). De acuerdo con este hecho, hemos observado en la corteza entorrinal (presente trabajo) y en el hipocampo (Jimenez y col., 2008) la expresión de IGF1 por parte de la microglía localizada alrededor de las placas y, además, estas células poseen capacidad fagocítica para el A β . La diferenciación microglial a un estado u otro puede estar mediada por la presencia de interleuquinas anti- o pro-inflamatorias (Butovsky y col., 2006). En este sentido, la presencia de IL4 se considera fundamental para la diferenciación al estado alternativo, en tanto que IL12, IL6 y/o IL17 son características del estado clásico pro-inflamatorio. Los resultados del presente trabajo en la corteza entorrinal y en el hipocampo (Jimenez y col., 2008) demuestran la presencia de IL4 desde edades tempranas. La expresión de IL4 se localiza en los astrocitos reactivos que rodean las placas a los 6 meses de edad y en los astrocitos y linfocitos Th2 (CD3 positivos) a los 12-18 meses de edad. Como consecuencia, la diferenciación al estado alternativo parece estar mediada por, al menos, la expresión de IL4. La IL4 producida por los astrocitos podría ser suficiente para diferenciar la microglía al estado alternativo. Sin embargo, no conocemos si existen otros mediadores en el proceso de diferenciación alternativa de la microglía o si otros tipos celulares están implicados en este proceso. Es posible que las placas de A β constituyan la señal primaria para la diferenciación de los astrocitos y la producción de interleuquinas anti-inflamatorias.

Por otro lado, la microglía asociada a las placas es capaz de internalizar péptidos de A β , por lo que se ha sugerido que la microglía posee un papel activo en el mantenimiento del tamaño de las placas amiloides (Bolmont y col., 2008). Además, la eliminación génica (knockout) del receptor TLR2 (Richard y col., 2008) o del receptor de quimioquinas CCR2 (El Khoury y col., 2007) en modelos animales de la EA, provoca un menor reclutamiento de células microgliales alrededor de las placas, lo que provoca un incremento de los niveles de A β ₄₂, acelerando los fallos de memoria e incrementando la patología vascular amiloide. Por lo tanto, es posible que la microglía activada alternativa que se encuentra asociada a las placas limitara la toxicidad del A β directamente, mediante fagocitosis (Simard y col., 2006; Jimenez y col., 2008), manteniendo los niveles de A β extracelular más bajos.

El papel específico de la activación microglial clásica aún no se conoce. Según la hipótesis inflamatoria del Alzheimer, la activación de la microglía podría mediar la degeneración neuronal mediante la liberación de factores citotóxicos, tales como citoquinas pro-inflamatorias (TNF α , FasL, TRAIL, IL1 β , IL6 entre otras), aminoácidos excitadores, especies reactivas de oxígeno (NO, superóxido) u otros factores (Craft y col., 2006; Mrak y Griffin, 2005; Ranaivo y col., 2006; Zipp y Aktas, 2006). La toxicidad de las neuronas frente a TNF α , factores relacionados e iNOS está bien estudiada (Uberti y col., 2006; Medeiros y col., 2007). Además, en nuestro modelo se ha observado una disminución significativa en la densidad de las neuronas principales en la corteza entorrinal (6 meses) y en el hipocampo (17 meses) coincidente en el tiempo con la aparición en ambas zonas de la activación de la microglía con fenotipo clásico. El establecimiento de una relación directa entre la producción de factores citotóxicos (TNF α , TRAIL, FasL y NO) y la presencia de A β extracelular (posiblemente oligómeros de A β solubles en el parénquima cortical) podría contribuir

directamente a la neurodegeneración de interneuronas y neuronas principales en la corteza entorrinal y neuronas piramidales en el hipocampo a las edades anteriormente mencionadas.

TNF α es un factor clave en la regulación de la respuesta inflamatoria, capaz de interaccionar con dos receptores diferentes, TNFR1 y TNFR2, que desencadenan múltiples respuestas celulares, como son la muerte celular, supervivencia, diferenciación, proliferación y migración. En el SNC, son las células microgliales y astrogiales las principales productoras de TNF α , en respuesta a procesos de infección, enfermedades inflamatorias, isquemia y daños traumáticos. Sin embargo, últimamente se le ha atribuido al TNF α tanto efectos perjudiciales como beneficiosos, ya que es capaz de promover tanto la supervivencia celular y proteger contra la toxicidad del glutamato y especies reactivas de oxígeno, como de provocar la apoptosis neuronal al unirse a su receptor específico de muerte TNFR, presente en neuronas, microglía y astrocitos (Tarkowski y col., 1999; Akiyama y col., 2000; Zhao y col., 2003; Tuppo y Arias, 2005; Heneka y O'Banion, 2007; Bradley, 2008). Esto se debe a que los dominios intracelulares de los receptores de TNF α son diferentes. La unión de TNF α soluble a TNFR1 provoca el reclutamiento de TRADD (proteína de dominio de muerte asociada a TNF α) que al unirse a FADD (proteína con dominio de muerte asociada a Fas) es capaz de reclutar pro-caspasa 8 e iniciar la vía apoptótica, principalmente. Por otro lado, TNFR2 (sin dominio de muerte intracelular) se une preferentemente a TNF α unido a membrana e inicia una vía de señalización alternativa completamente opuesta, según los niveles extracelulares de TNF α (ver revisión Bradley, 2008). Es posible que el resultado final de la actuación del TNF α sea dependiente de la concentración a la que se encuentra.

Podríamos especular que las neuronas que sufren el proceso neurodegenerativo en la corteza entorrinal son aquellas con niveles más bajos del factor pro-supervivencia FAIM_L y/o Lifeguard, con una capacidad de supervivencia neuronal comprometida, como ocurre en las capas profundas de la corteza entorrinal. Estos factores actúan inhibiendo la vía apoptótica activada por los receptores de muerte, como TNFR1 y/o Fas, por lo que, tal vez, sea en la expresión de estos factores donde resida la diferente vulnerabilidad neuronal. Por este motivo sería necesario realizar experimentos de doble marcaje empleando anticuerpos contra FAIM_L y SOM/NPY para conocer si las interneuronas SOM/NPY-positivas resistentes a la neurodegeneración son específicamente las que expresan el factor pro-supervivencia.

En la corteza entorrinal de nuestro modelo hemos encontrado un incremento tanto de los niveles de TNF α como de su receptor TNFR1, que posee un dominio de muerte citoplasmático. Recientemente, se ha demostrado que la activación de la vía de TNFR1 es necesaria para la muerte neuronal inducida por el A β , aunque se desconoce la función de este receptor en la patología amiloide. De hecho, la eliminación del gen de TNFR1 en un animal transgénico para la EA inhibe la generación de A β y disminuye la formación de placas amiloides (He y col., 2007). Además, TNFR1 regula la actividad del promotor de BACE1 y la eliminación de TNFR1 en el transgénico reduce la presencia de microglía activada y previene los déficit de memoria y aprendizaje, por lo que TNFR1 además de estar implicado en el proceso neurodegenerativo también estaría implicado en el procesamiento

de APP y las formación de placas amiloides (He y col., 2007). Esto podría significar que existe un sistema de retroalimentación positiva entre la formación de placas amiloides y el proceso inflamatorio, ya que la existencia de A β genera la aparición de una respuesta inflamatoria, con producción de TNF α y sobre-regulación de TNFR1 y éste, a su vez, favorece la formación de A β y su depósito en forma de agregados extracelulares, incrementando la patología de la EA. Por lo tanto, la presencia de microglía activada clásica productora de TNF α en nuestro modelo animal posee efectos negativos sobre la patología amiloidea, incrementándola y generando, a su vez, la aparición de un proceso neurodegenerativo, favorecido por la producción de factores citotóxicos y la generación de A β .

En relación a las causas que inducen una diferenciación clásica de la microglía, resultados previos del grupo en el hipocampo de este modelo transgénico han demostrado que una de las causas que determinan el cambio fenotípico en la microglía de alternativo a clásico, a los 18 meses, es el aumento en las formas oligoméricas solubles del A β . Estos oligómeros estimulan la producción de TNF α , iNOS y TRAIL en cultivos microgliales *in vitro* (Jimenez y col., 2008). En base a estos datos, propusimos que el aumento en la producción de A β durante el envejecimiento conlleva a la activación microglial citotóxica. En el caso de la activación clásica temprana en la corteza entorrinal, no disponemos actualmente de datos que confirmen si existe un aumento de A β oligomérico soluble a esta edad. Sería necesario comprobar este hecho para profundizar en los mecanismos de diferenciación microglial en esta región cerebral. El conocimiento de estos mecanismos es de gran importancia, ya que la modulación del cambio fenotípico de la microglía podría constituir una estrategia terapéutica importante contra el Alzheimer. Para ello, sería importante conocer cuáles son los factores inductores y los receptores implicados en la diferenciación microglial.

En la regulación del fenotipo microglial juega un papel importante el control neuronal. En este sentido, los niveles de fractalquina, citoquina neuronal que inhibe la activación microglial clásica, están disminuidos en el hipocampo en los animales PS1xAPP a los 18 meses de edad, pero no a los 6 meses (resultados preliminares del grupo del Dr. Vitorica), mientras que, en la corteza entorrinal, esta disminución se produce entre los 2 y 4 meses de edad. Estos resultados explicarían la existencia de un ambiente citotóxico microglial en la corteza entorrinal y no en el hipocampo a edades tempranas. Se ha demostrado que la fractalquina es capaz de inhibir la liberación de TNF α (Zujovic y col., 2000), por lo que una disminución en la expresión de fractalquina provocaría una mayor liberación de TNF α por parte de la microglía activada con fenotipo clásico. Es más, recientemente se ha demostrado que los niveles de fractalquina soluble en plasma son menores en pacientes con Alzheimer severo en comparación con pacientes con fallos cognitivos moderados (Kim y col., 2008).

4.4.3. La corteza entorrinal y el hipocampo poseen ambientes inflamatorios completamente opuestos en el modelo PS1xAPP a los 6 meses de edad

Como hemos comentado anteriormente, en los animales PS1xAPP de 6 meses de edad, la respuesta inflamatoria asociada a la deposición de A β muestra perfiles opuestos en

dos de las regiones cerebrales más afectadas por la patología amiloide. A esta edad en la corteza entorrinal existe una inflamación de carácter citotóxico, mientras que en el hipocampo la inflamación tiene un carácter neuroprotector. Este hecho ha sido también comprobado en muestras microdisseccionadas por láser de ambas regiones obtenidas a partir de los mismos animales (presente trabajo y Baglietto-Vargas, 2008). En la figura 4.3, se muestra el perfil no citotóxico de la respuesta glial en el estrato oriens del hipocampo de los mismos animales transgénicos de 6 meses de edad que han sido utilizados en los estudios de RT-PCR de la corteza entorrinal del presente trabajo.

A los 6 meses de edad, existe una clara inducción de los marcadores de microglía (CD11b) y astrogliá (GFAP) en el hipocampo de estos animales. Sin embargo, no existe aumento de los factores citotóxicos TNF α , iNOS y FasL. Por lo tanto, a edades tempranas, la diferenciación glial en el hipocampo es de naturaleza anti-inflamatoria. No es hasta los 18 meses de edad, cuando se observa un ambiente pro-inflamatorio citotóxico en el hipocampo (Jimenez y col., 2008). Entonces, la corteza entorrinal a los 6 meses de edad, presenta una respuesta inflamatoria similar a la que se produce en el hipocampo a los 18 meses, explicando que la muerte neuronal tenga lugar antes en la corteza entorrinal que en el hipocampo en nuestro modelo PS1xAPP, al igual que ocurre en los pacientes de Alzheimer. Esta diferencia regional también ha sido descrita en el modelo triple transgénico, en el que existe una inducción temprana de la respuesta inflamatoria (activación microglial) con una gran expresión de TNF α en la corteza entorrinal acompañada de la aparición de placas amiloides que no se detecta en el hipocampo del animal a la misma edad (Janelins y col., 2005).

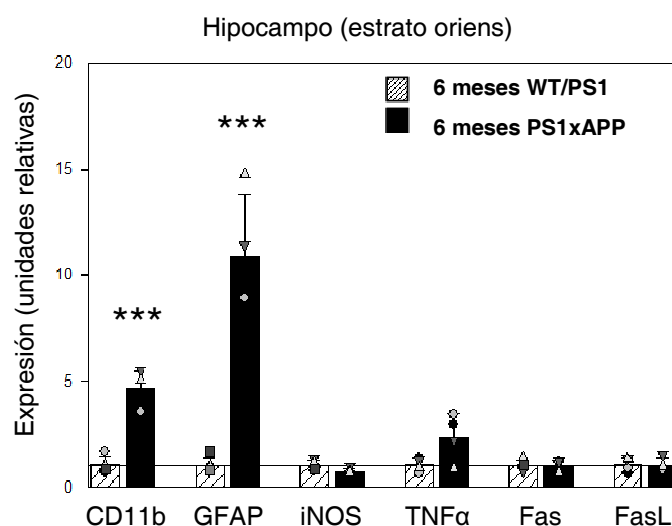


Figura 4.3. Expresión, en unidades relativas, de los niveles de ARNm de marcadores de inflamación en muestras microdisseccionadas por láser del estrato oriens del hipocampo de animales WT/PS1 (controles) y PS1xAPP a los 6 meses de edad. A esta temprana edad, los marcadores específicos para microglía (CD11b) y astrogliá (GFAP) se encuentran significativamente incrementados en el hipocampo de los animales PS1xAPP en comparación con los controles de la misma edad, mientras que los marcadores de fenotipo citotóxico (iNOS, TNF α , Fas y FasL) no muestran diferencias significativas con los controles. T de Student, ***p<0,001.

Algunos estudios clínicos sugieren que existe una reducción del riesgo de padecer Alzheimer y una atenuación de los síntomas si los pacientes son tratados con AINES (Stewart y col., 1997; Aisen, 2000). Sin embargo, otros estudios parecen no encontrar ningún efecto positivo con estos agentes anti-inflamatorios no esteroideos (Aisen y col., 2003; Bennett y Whitmer, 2009; Breitner y col., 2009). Algunos, pero no todos los AINES, son capaces de reducir las placas de A β en animales transgénicos de la EA, mediante la inhibición de la ciclooxygenasa o mediante un efecto directo sobre la γ -secretasa, reduciendo la producción de A β , independientemente de la inhibición de COX (Eriksen y col., 2003). El principal mecanismo de actuación de los AINES es la inhibición competitiva de la actividad COX, lo que reduce la producción de prostaglandinas. COX, además de mediar en la producción de prostaglandinas y otros factores inflamatorios, es activada en presencia de mediadores pro-inflamatorios, como TNF α , IL1 y especies reactivas de oxígeno, provocando una amplificación de la respuesta inflamatoria.

La existencia de procesos inflamatorios opuestos al mismo tiempo en las regiones más vulnerables en la EA, como son la corteza entorrinal y el hipocampo, podría explicar los resultados controvertidos del empleo terapéutico de los AINES en la EA (McGeer y McGeer, 2007; Aisen, 2008). Por lo tanto, estas diferencias regionales en relación a la neuroinflamación y su naturaleza (protectora/perjudicial) deben de ser tenidas en cuenta en las terapias que utilicen fármacos anti-inflamatorios. Sería muy interesante el desarrollo de fármacos que potencien por un lado el perfil neuroprotector de la respuesta inflamatoria y que, por otro, reduzcan sus efectos nocivos.

4.5. La administración crónica de carbonato de litio en la dieta posee un efecto neuroprotector en la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP

4.5.1. El tratamiento con litio previene la neurodegeneración temprana

La administración oral de carbonato de litio en la dieta de los animales PS1xAPP evita el proceso neurodegenerativo en la corteza entorrinal (presente trabajo) y en el hipocampo (datos no publicados). Los animales tratados no muestran degeneración de las interneuronas SOM y NPY, siendo la densidad celular de estas poblaciones similar a la de los animales WT. Además, el tratamiento con litio protege de la formación de neuritas distróficas. Cualitativamente, las neuronas principales de capas profundas parecen también estar protegidas.

Existen estudios en los que se demuestra que el litio posee un efecto neuroprotector frente a la muerte neuronal inducida por la presencia de A β (Alvarez y col., 1999; Wada y col., 2005; Zhong y Lee, 2007). Además, el tratamiento crónico con litio reduce las lesiones (mejora el aprendizaje) y la neurodegeneración producida por la presencia de tau hiperfosforilada (Noble y col., 2005; Nocjar y col., 2007). Los efectos neuroprotectores del litio pueden estar relacionados con la cascada de señalización de GSK3 o incluso con la regulación de otras quinasas implicadas en los procesos neurodegenerativos como CDK5 y

SAPK (Iijima y col., 2000; Ryder y col., 2003). Además, el litio es capaz de regular la expresión de oncogenes como Bcl-2, p53 y Bax (Chen y Chuang, 1999), inhibir a la fosfolipasa A2 (Mora y col., 2002), regular la vía de señalización de c-Jun (Yuan y col., 1999) y regular la expresión y función de factores de transcripción que se unen a la proteína activadora-1 y AMPc, que juegan un papel muy importante en la regulación de la supervivencia celular (Ozaki y Chuang, 1997; Yuan y col., 1999). Incluso, el litio administrado en dosis terapéuticas es capaz de regular el metabolismo del inositol (O'Donnell y col., 2000; Williams y col., 2002) y activar la vía de señalización PI3K-Akt (Chalecka-Franaszek y Chuang, 1999; Mora y col., 1999), la cual inhibe a la GSK3 y, por lo tanto, promueve la supervivencia celular (Cross y col., 1995; Shaw y Cohen, 1999; Hashimoto y col., 2002).

Recientemente, se ha propuesto que deficiencias en la fusión de las vesículas autofágicas con los lisosomas podrían ser el origen de las neuritas distróficas, observadas tanto en pacientes como en modelos de EA, así como de la producción de A β y de la muerte neuronal mediada por A β (Yu y col., 2005; Yang y col., 2008). La alteración o disminución de la vía autofágica en los animales PS1xAPP explicaría la aparición de neuritas distróficas, así como el aumento de A β extracelular. Se ha demostrado que el litio es un inductor de la autofagia, favoreciendo la vía de degradación lisosomal autofágica (Sarkar y col., 2005; Sarkar y Rubinsztein, 2006). Estudios recientes muestran que la administración de litio ralentiza la progresión de enfermedades neurodegenerativas, como la esclerosis lateral amiotrófica tras inducir el proceso de autofagia (Fornai y col., 2008). Un aumento de los procesos de autofagia en nuestros animales transgénicos tratados con litio explicaría la disminución de las neuritas distróficas tanto en corteza entorrinal como en el hipocampo.

La autofagia es la única vía de la célula para el recambio de los orgánulos y es vital para la degradación normal de las proteínas agregadas, sobre todo bajo condiciones de estrés o en presencia de daños celulares. Recientemente, se ha demostrado que el A β también es generado en orgánulos ricos en APP que intervienen en el proceso de autofagia, junto con un proceso de endocitosis. El A β producido durante la autofagia es posteriormente degradado por los lisosomas (Nixon, 2007). En las neuronas, los autofagosomas y los endosomas se forman de manera activa en las sinapsis y en los procesos neuríticos. La eliminación de estas vesículas requiere su transporte retrógrado hacia el cuerpo celular, donde se encuentran concentrados la mayoría de los lisosomas. En la EA, la maduración de los autofagolisosomas y su transporte retrógrado no se producen de la manera correcta, lo que conlleva a la acumulación masiva vacuolas autofágicas en las neuritas distróficas. La combinación del incremento en la inducción de la autofagia junto con los defectos en la eliminación de las vacuolas autofágicas en las que se genera A β , genera condiciones favorables para la acumulación de A β en la EA (Nixon, 2007). Además, en pacientes Alzheimer existe una disminución de los niveles de beclina-1, que es una proteína esencial en la vía de la autofagia, lo que promueve la acumulación intra- y extracelular de A β y, finalmente, la neurodegeneración (Pickford y col., 2008). Por lo tanto, la restauración de la vía autofágica (a través de la beclina, por ejemplo), podría ser una terapia potencial para el tratamiento del Alzheimer. Es más, la autofagia puede ser modulada por fármacos, como la rapamicina, ya aprobados para otras patologías, como el Huntington (Sarkar y col., 2008).

Teniendo en cuenta todo esto, es tentador especular que la administración crónica de carbonato de litio en la dieta de los animales PS1xAPP podría ejercer un efecto neuroprotector sobre el proceso neurodegenerativo, posiblemente mediante la inducción de la vía autofágica, incrementando el recambio de las proteínas y/o los orgánulos que están dañados y regenerando las neuritas distróficas tras la eliminación correcta de las vesículas autofagolisosomales, evitando así la inducción de la apoptosis neuronal por acumulación de proteínas dañadas, vesículas o fallos en el transporte axonal o sináptico. En apoyo de esta idea, resultados preliminares (del grupo del Dr. Vitorica) demuestran el aumento de expresión de Beclina-1 (proteína directamente implicada en la inducción de la autofagia) y la acumulación de LC3-II (implicado en la formación de autofagosomas) en animales PS1xAPP de 18 meses. Estos resultados podrían reflejar una disminución en el proceso de fusión de los autofagosomas con los lisosomas (Boland y col., 2008).

4.5.2. El tratamiento con litio no parece afectar a la carga amiloide, aunque sí reduce la activación microglial citotóxica

Si, efectivamente, existe una inducción del proceso de autofagia en los animales tratados con litio, sería esperable observar una disminución de los niveles de A β y, por tanto, una disminución de la formación de placas y de la activación microglial. En la corteza entorrinal de nuestro modelo no hemos observado apenas diferencias en la carga amiloide de la corteza entorrinal entre los animales que han mantenido una dieta estándar y aquellos que han mantenido una dieta suplementada con carbonato de litio de forma cualitativa. Estos resultados indicarían que este suplemento con litio no afecta a la formación de placas, aunque es posible que esto ocurriera con un tratamiento más prolongado. Este mismo efecto se ha observado tras la administración de litio en el transgénico 3xTg-AD, en el que el litio es capaz de reducir los niveles de fosforilación de tau, pero no altera significativamente la carga de A β ni los fallos en la memoria de trabajo en el animal (Caccamo y col., 2007). Sin embargo, datos previos de nuestro grupo de investigación (no publicados) muestran que en el hipocampo de los animales PS1xAPP que han sido tratados con carbonato de litio, presentan una disminución del número de placas A β que tienen un tamaño grande (>200 μm^2), mientras que existe un aumento significativo del número de placas pequeñas (<200 μm^2), por lo que la administración de litio evita que las placas de A β se hagan cada vez más grandes (por disminución de los niveles de A β y/o incremento fagocitosis de la microglía), lo que supone que mantienen un perímetro más pequeño que, posiblemente, permita mejor su eliminación por parte de la microglía fagocítica. Además, en el hipocampo de los animales tratados con litio se ha observado que existen niveles menores de A β_{42} soluble, lo que provocaría una menor inducción de la microglía, disminuyendo el proceso inflamatorio en estos animales, tal y como hemos observado que ocurre en la corteza entorrinal.

La administración de litio es capaz de inhibir a la enzima GSK3 (implicada en la hiperfosforilación de tau) y, por lo tanto, disminuir la formación de ovillos neurofibrilares intracelulares, como se ha podido comprobar en varios transgénicos para la EA, como en el animal que sobre-expresa una forma mutada humana de tau Tau_{P301L} (Noble y col., 2005) o

el triple transgénico (Caccamo y col., 2007). Sin embargo, su acción sobre la carga amiloide o la disminución de los depósitos extracelulares de A β no es tan clara. Existen estudios en los que se ha observado que GSK3 α puede afectar al procesamiento del APP (Phiel y col., 2003; Su y col., 2004), por lo que, en principio, la ingesta de litio podría disminuir los niveles de A β , aunque, por otro lado, existen estudios *in vitro* que muestran que el litio incrementa los niveles de A β de forma independiente a la inhibición de la GSK3 (Feyt y col., 2005). Además, el litio inhibe directamente a la GSK3 β (Klein et al., 1996), por lo que se ha propuesto que la modulación de la actividad de esta proteína a través del litio podría considerarse como un mecanismo de neuroprotección molecular (Li et al., 2002), aunque los mecanismos a través de los que regula la actividad de la GSK3 β no se conocen totalmente. Existen múltiples estudios que apoyan la posibilidad de que el litio regule la vía PIK3-Akt (Klein y Melton, 1996; Chalecka-Franaszek y Chuang, 1999; Mora y col., 1999; Takahashi y col., 1999; Bhat y col., 2000; Elyaman y col., 2002; Mai y col., 2002), que se encuentra justo por encima de la vía de la GSK3 β (Cross y col., 1995).

En relación a la activación glial, los animales PS1xAPP que han mantenido una dieta suplementada con carbonato de litio presentan microglía activada asociada a los depósitos de A β . Sin embargo, sí hemos apreciado que la cantidad de microglía asociada a placa y, de forma más importante, la interplaca (fenotipo clásico productor de TNF α), se ve disminuida en comparación con el grupo control. Esta disminución de la activación clásica explicaría la supervivencia neuronal que muestran los animales tratados con litio. La disminución de la microglía activada alrededor de las placas puede deberse al tipo de placas que se están acumulando extracelularmente en los animales tratados con litio. Se sabe que en pacientes de EA la microglía es reclutada alrededor de las placas neuríticas y de núcleo denso, pero no alrededor de las placas difusas (Nagele y col., 2004), por lo que es posible que en los animales tratados con litio exista una mayor proporción de placas difusas en lugar de placas neuríticas en comparación con los animales que han mantenido una dieta estándar. Por otro lado, en estudios previos, hemos demostrado que en el hipocampo de animales viejos la activación clásica microglial es inducida por los niveles de A β oligomérico soluble extracelular (Jimenez y col., 2008) y no por las placas en sí. Por lo tanto, podríamos especular que el litio en nuestros animales tratados, aunque no reduce el número de placas, sí induce una disminución de los niveles de este tipo de A β , probablemente por inducción de la autofagia y, por tanto, produce una reducción de la diferenciación microglial. Aún no hemos determinado experimentalmente los niveles de A β soluble, debido a que no disponemos de las muestras necesarias, sin embargo, está previsto hacerlo en futuros experimentos del grupo. Sí disponemos de datos preliminares de que el tratamiento con litio produce una disminución de los niveles de C99 en el hipocampo sin modificar los niveles de A β ni APP (resultados no publicados).

Esta reducción de la activación glial con la administración de litio se ha observado también en modelos de inflamación, en los que se les ha inyectado intracerebro-ventricularmente LPS, que poseen efectos inflamatorios en el SNC. Las ratas tratadas con cloruro de litio mostraban un menor número de áreas cerebrales afectadas por el proceso inflamatorio en comparación con las que mantenían una dieta estándar. Además, los

animales tratados con litio poseían concentraciones menores de prostaglandinas que los controles (Basselin y col., 2007). Luego la administración de litio en la dieta para reducir el proceso inflamatorio debería ser tomada en cuenta para disminuir la inflamación asociada tanto a la EA como en otras patologías del SNC que se acompañen de un proceso neuroinflamatorio crónico perjudicial. Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que la administración oral crónica de litio posee un efecto neuroprotector en la corteza entorrinal del modelo PS1xAPP, promoviendo supervivencia celular, evitando la formación de neuritas distróficas y frenando la activación glial citotóxica. Estos efectos podrían ser ejercidos por el litio a través de la inducción de los procesos de autofagia celular, disminuyendo la formación de péptidos de A β oligoméricos solubles. Esta hipótesis será objeto de estudio del grupo de investigación en los próximos años.

4.6. Reflexión final

En resumen, la pérdida de neuronas principales de la corteza entorrinal en el modelo PS1xAPP se produce antes que en el hipocampo, al igual que se ha descrito en pacientes de Alzheimer. Además, la neurodegeneración de interneuronas que expresan SOM y/o NPY también se produce en la patología humana, por lo que estos neuropéptidos podrían ser buenos biomarcadores de la enfermedad. La pérdida de las interneuronas se correlaciona con la respuesta inflamatoria citotóxica, mientras que la muerte de las neuronas principales podría deberse, preferentemente, a la existencia de A β extracelular y no a la acumulación de A β intracelular. Este proceso neurodegenerativo podría ser el responsable de los fallos de memoria y aprendizaje que se producen en estadios tempranos de la enfermedad de Alzheimer.

En la corteza entorrinal a los 6 meses de edad predomina la activación microglial clásica (productora de TNF α) localizada en la región interplaca, frente a la activación microglial de fenotipo alternativo (Ym1⁺, fagocítica y productora de IGF1), que se encuentra rodeando las placas. Por otro lado, a esta misma edad, en el hipocampo existe una activación microglial alternativa asociada a placas (Ym1⁺, productora de IGF1 y fagocítica), lo que genera un ambiente neuroprotector a edades tempranas, mientras que, a edades tardías (18 meses), existe un cambio del fenotipo microglial, predominando la microglía activada clásica citotóxica (TNF α ⁺). Sabemos que este cambio en la activación microglial viene determinado en el hipocampo por el aumento del A β oligomérico soluble y un descenso en los niveles de expresión de fractalquina, aunque podrían existir más factores implicados. Es posible que la dominancia del fenotipo clásico frente al alternativo en la corteza entorrinal a los 6 meses de edad esté determinada por el descenso de los niveles de fractalquina, lo que favorece la producción de TNF α por parte de la microglía citotóxica.

Teniendo en cuenta que, además, los niveles de FAIM_L y Lifeguard disminuyen, la capacidad de supervivencia neuronal está comprometida. Inclusive, podemos pensar que los niveles de A β oligomérico soluble pueden estar incrementados en la corteza entorrinal, favoreciendo el ambiente citotóxico específicamente en esta región. No descartamos la intervención de otros factores, como una modulación en los receptores microgliales u otras

Discusión

moléculas de expresión neuronal que intervengan en la comunicación neurona-glía. Por lo tanto, ambas regiones cerebrales muestran un grado de afectación diferente a lo largo de la progresión de la enfermedad. Por este motivo es posible que cada tipo neuronal y cada región cerebral muestre una afectación o vulnerabilidad diferente frente diferentes ambientes neurotóxicos. En la Fig. 4.4 se resume cronológicamente los principales eventos neuropatológicos del modelo PS1xAPP, comparando la corteza entorrinal y el hipocampo a edades tempranas y tardías.

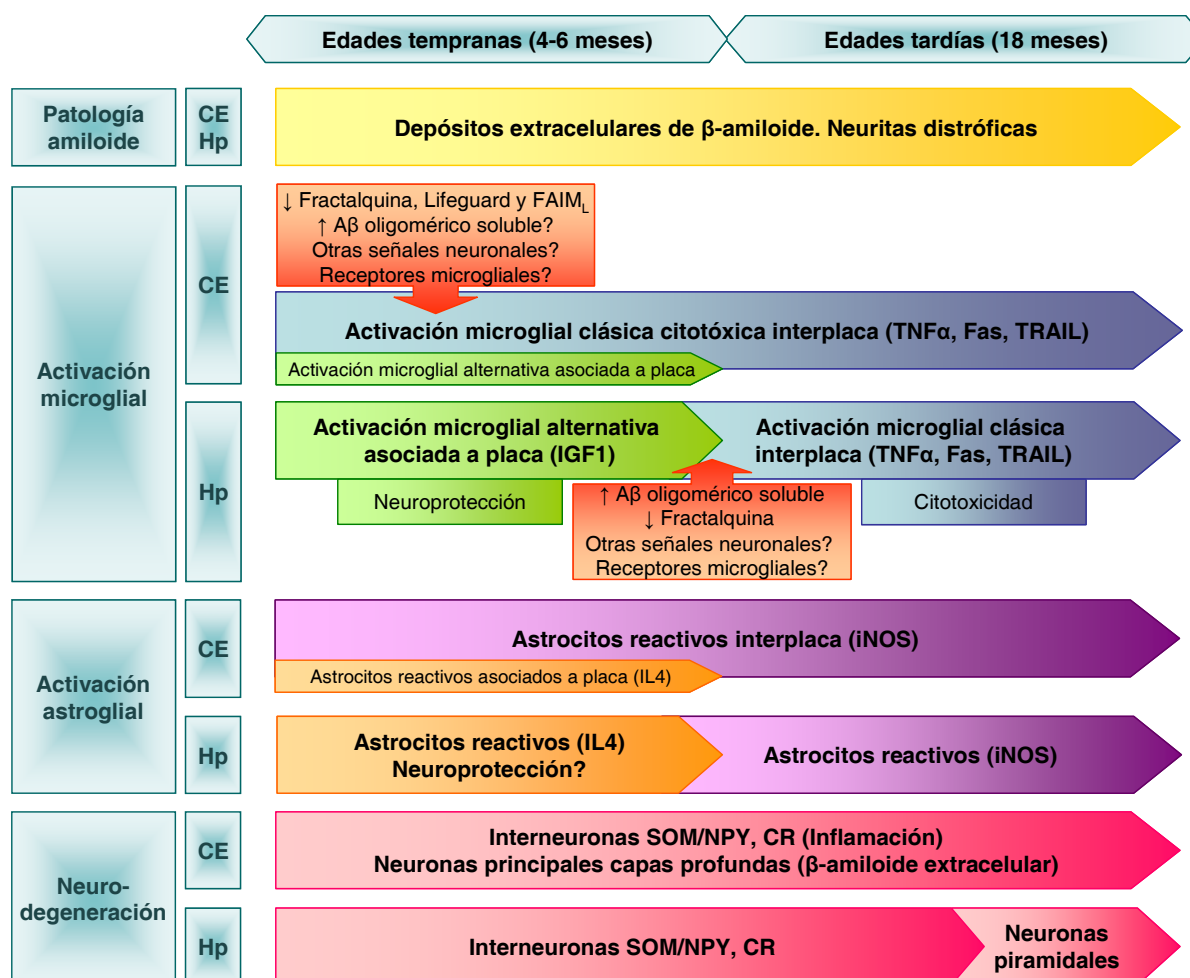


Figura 4.4. Resumen comparativo entre la corteza entorrinal y el hipocampo de la patología del modelo PS1xAPP a edades tempranas (4-6 meses) y tardías (18 meses). La patología amiloide acontece de forma similar en la corteza entorrinal y el hipocampo. El A β extracelular provoca la activación glial y ambas intervienen en el proceso neurodegenerativo. Mientras que la activación microglial posee un fenotipo clásico citotóxico en la corteza entorrinal desde edades tempranas, posiblemente debido a la disminución local de señales neurona-glía, como la fractalquina, y al descenso en los niveles de factores pro-supervivencia, como Lifeguard y FAIM_L, en el hipocampo el fenotipo microglial mayoritario a edades tempranas es el alternativo de naturaleza neuroprotectora, con producción de IGF1. Sin embargo, a edades tardías, el aumento de A β oligomérico soluble, la disminución de fractalquina y, seguramente, la modulación de otros factores, provoca que la microglía activada posea un perfil principalmente citotóxico y la astroglia produzca mayores niveles de NO, por lo que el ambiente es más similar al de la corteza entorrinal en edades tempranas. Esto conlleva a que el proceso neurodegenerativo en la corteza entorrinal se produzca de forma más temprana que en el hipocampo.

En la corteza entorrinal de los animales transgénicos PS1xAPP de 6 meses de edad, existe un desbalance entre la neuroprotección y la neurotoxicidad. La acumulación de placas amiloides, principalmente en las capas profundas de la corteza entorrinal, provoca un aumento en los niveles de A β oligomérico extracelular soluble, debido al intercambio de las formas oligoméricas entre las placas y el medio. Estas formas solubles son, seguramente, de naturaleza citotóxica (como se ha podido comprobar en el hipocampo, Jimenez y col., 2008), provocando la activación microglial clásica, de características citotóxicas en las regiones interplaca. Esta microglía clásica es productora en grandes cantidades de TNF α , ligando del receptor de muerte TNFR1 que, posiblemente, sea sobre-expresado por aquellas neuronas que vean su supervivencia comprometida por la presencia tanto del A β extracelular como de los factores pro-inflamatorios que se están produciendo. Es muy posible que las neuronas que sufren el proceso neurodegenerativo en la corteza entorrinal sean aquellas que tengan niveles más bajos del factor pro-supervivencia FAIM_L y/o Lifeguard, ya que éstos actúan inhibiendo la vía apoptótica activada por los receptores de muerte, como TNFR1 y Fas. La muerte neuronal y/o un descenso propio de los niveles de fractalquina por parte de las neuronas generan, además, una mayor producción de TNF α , generando un ciclo vicioso. Además, es posible que la disminución de los procesos de autofagia celular, implicados en la eliminación de A β por endocitosis, pudieran aumentar los niveles de este péptido. Sin embargo, aunque de forma más somera, también existe una activación microglial alternativa (Ym1⁺) asociada a placa, con capacidad fagocítica y productora de IGF1. La IL4, producida tanto por los linfocitos Th2 (anti-inflamatorios) y por los astrocitos reactivos asociados a las placas amiloides, es un potente inductor de la activación microglial alternativa, aunque en la corteza entorrinal, la expresión de IL4 e IGF1 no es muy elevada, lo que se traduce en un proceso neuroprotector insuficiente para la supervivencia neuronal (neuronas principales de capas profundas e interneuronas SOM, NPY y CR positivas). Estas células están rodeadas por un potente proceso pro-inflamatorio neurotóxico que genera, junto con el A β extracelular soluble, su muerte en la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP a la temprana edad de 6 meses. El resumen de los procesos neuropatológicos que se producen en la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP a los 6 meses de edad se muestra en el esquema de la Fig. 4.5.

Por lo tanto, este modelo recapitula algunos de los cambios neuropatológicos propios de la patología humana, mostrando ventajas sobre otros modelos existentes. Además, podría constituir una herramienta muy eficaz para evaluar nuevos fármacos que modularan, por ejemplo, la actividad glial, reduciendo las propiedades citotóxicas y/o incrementando los efectos neuroprotectores en las fases iniciales de la enfermedad de Alzheimer.

Nuestro estudio, además, sugiere que el tratamiento terapéutico con carbonato de litio podría actuar como agente neuroprotector en la patología de Alzheimer. Aunque desconocemos el mecanismo de acción del litio en nuestro modelo, en base a resultados preliminares del grupo del Dr. Vitorica (resultados no publicados) es tentador especular que, posiblemente, actúe a través de la inducción de procesos autofágicos, por lo que el empleo de fármacos implicados en la activación de estas vías deberían considerarse como futuras terapias de tratamiento de la enfermedad.

Discusión

En consecuencia, el presente trabajo provee evidencias de la naturaleza heterogénea de la patología de la enfermedad de Alzheimer, por lo que se debería tener en cuenta esta complejidad a la hora de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

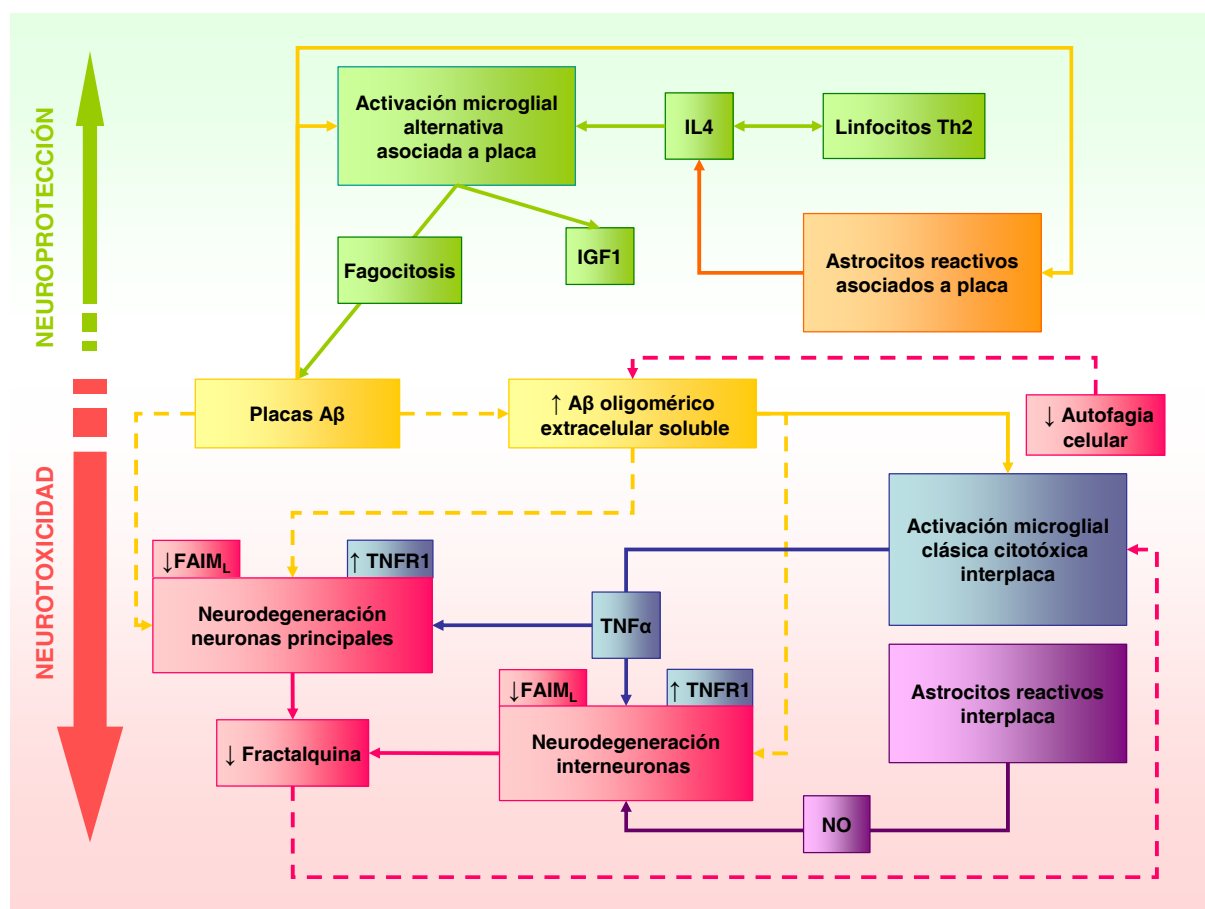


Figura 4.5. Esquema de los acontecimientos neuropatológicos que se producen en la corteza entorrinal de los transgénicos PS1xAPP a edades tempranas. Las placas amiloides inducen la activación microglial a su alrededor. Esta microglía presenta un fenotipo alternativo potencialmente neuroprotector (fagocitosis y producción de IGF1). Los astrocitos reactivos que rodean las placas y algunos linfocitos Th2 producen IL4 que, a su vez, podrían inducir el fenotipo alternativo microglial. A los 6 meses, las placas provocarían un aumento en los niveles de Aβ oligomérico extracelular soluble, lo que generaría la activación de la microglía clásica interplaca con características citotóxicas y la existencia de astrocitos reactivos, mientras que las placas amiloides mantendrían a su alrededor, en menor medida, la microglía de fenotipo alternativo con características neuroprotectoras. El desbalance existente a los 6 meses de edad entre ambas respuestas provoca un mayor ambiente neurotóxico, que junto con altos niveles de Aβ extracelular, serían los agentes inductores del proceso neurodegenerativo tanto en las neuronas principales de las capas profundas como en las interneuronas que expresan SOM, NPY y CR en la corteza entorrinal de los animales PS1xAPP. Una disminución del proceso de autofagia podría ser también el causante de un aumento de los niveles de Aβ oligomérico extracelular. Las líneas discontinuas representan los mecanismos propuestos.

5. Conclusiones/ Conclusions

1. A los 6 meses de edad, la corteza entorrinal de este modelo transgénico PS1xAPP sufre un proceso neurodegenerativo selectivo que afecta a las neuronas principales de capas profundas. Esta pérdida neuronal precede en el tiempo a la del hipocampo, al igual que ocurre en los pacientes de Alzheimer y podría ser responsable de las deficiencias cognitivas que ocurren en fases tempranas de la enfermedad. Este modelo mimetiza ciertos aspectos neurodegenerativos de la patología humana y, por tanto, exhibe ventajas sobre otros modelos actuales para estudiar la patogénesis de esta enfermedad y evaluar a nivel preclínico posibles tratamientos farmacológicos.
2. Al igual que en el hipocampo, en la corteza entorrinal de este modelo existe neurodegeneración temprana y prominente de las interneuronas SOM/NPY-positivas y en menor medida de las interneuronas CR-positivas, mientras que aquellas que expresan PV no se encuentran afectadas. Teniendo en cuenta que la disminución preferencial de SOM/NPY ha sido descrita en pacientes de Alzheimer, los resultados en nuestro modelo animal podrían constituir un evento temprano asociado a esta patología. Por lo tanto, los neuropéptidos SOM y NPY podrían ser buenos biomarcadores para determinar la eficacia de futuros tratamientos en las fases tempranas de esta enfermedad.
3. En base a la ausencia de expresión del transgén APP humano mutado en las interneuronas y las neuronas principales de la capa V, el A β extracelular, y no su acumulación intracelular, parece ser el principal agente inductor del proceso neurodegenerativo en la corteza entorrinal de este modelo. Los depósitos de A β se localizan de forma preferente en las capas profundas desde los 4 meses de edad, pudiendo ejercer un efecto neurotóxico directo, o bien indirecto, a través de la activación glial
4. Coincidente con la aparición de depósitos de A β , se desarrolla una respuesta inflamatoria temprana con extensa y compleja activación glial. El perfil de esta respuesta es potencialmente citotóxico, con expresión de TNF α por la microglía activada interplaca y de iNOS por los astrocitos reactivos. Este ambiente glial tóxico podría ser el principal responsable de la muerte de interneuronas SOM/NPY que ocurre tanto en capas superficiales como profundas.
5. Los resultados de este trabajo ponen de manifiesto la importancia de la respuesta inflamatoria asociada al A β y de los diferentes fenotipos gliales en la progresión del proceso neurodegenerativo en la corteza entorrinal. Una posible modulación farmacológica de la diferenciación microglial que potencie la neuroprotección abre futuras vías para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra el Alzheimer.
6. La corteza entorrinal y el hipocampo presentan respuestas neuroinflamatorias completamente opuestas en las fases iniciales de la patología amiloide, poniendo de

Conclusiones

relieve la heterogeneidad de esta enfermedad a nivel regional y celular y que, además, podría explicar los resultados controvertidos en los ensayos clínicos con fármacos anti-inflamatorios no esteroideos para prevenir o paliar los síntomas del Alzheimer.

7. El tratamiento oral crónico con carbonato de litio promueve la supervivencia neuronal y reduce la activación glial citotóxica en la corteza entorrinal de este modelo transgénico PS1xAPP. Por lo tanto, nuestro estudio apoya el uso potencial del litio como agente neuroprotector en tratamientos farmacológicos preventivos o en fases iniciales del Alzheimer.

1. There is a selective neurodegenerative process that affects principal neurons in deep layers of the entorhinal cortex of this AD model at the age of 6 months. This neuronal loss precedes that occurring in the hippocampus, as also seen in AD patients, and it might be responsible for the early cognitive deficits. This model mimics some aspects of the human pathology, exhibiting some advantages over other current AD models to study the disease pathogenesis and progression, as well as evaluate potential pharmacological treatments.
2. As in hippocampus, in the entorhinal cortex there is an early and prominent loss of SOM/NPY interneurons, and in less extent of CR cells. However, PV interneurons are not affected in this transgenic model. A reduction of SOM/NPY also occurs in AD patients, supporting our findings in this PS1xAPP model as an early event associated to this pathology. Therefore, SOM and NPY neuropeptides could constitute important biomarkers to assess the efficacy of potential early AD treatments.
3. The lack of mutated human APP transgen expression by interneurons and layer V principal cells suggests that extracellular A β , rather than intracellular accumulation, is the major contributor of the neurodegenerative changes in the entorhinal cortex of this AD model. A β deposits are preferentially localized in deep layers since 4 months of age, and could mediate a direct neurotoxic effect, or indirectly through glial activation
4. Coincident with A β deposition, there is an early inflammatory response with extensive and complex glial activation. The profile of this process is potentially cytotoxic with expression of TNF α by interplaque activated microglia and iNOS by reactive astrocytes. The loss of SOM/NPY cells occurs in superficial and deep layers of entorhinal cortex and could be mediated by this toxic glial environment.
5. These findings highlight the role of the A β associated neuroinflammatory process and the different microglial phenotypes in the disease progression of the entorhinal cortex. Pharmacological control of microglial differentiation, which may potentiate neuroprotection, opens new research opportunities to develop therapeutic strategies against AD.
6. The entorhinal cortex and hippocampus display opposite neuroinflammatory profiles at early stages of the A β pathology. This reflects the heterogeneous nature of this disease at the regional and even cellular level, and might explain the controversial results obtained in the clinical trials using non-steroidal anti-inflammatory drugs to prevent AD.
7. Chronic oral treatment with lithium carbonate promotes neuronal survival and reduces cytotoxic glial activation in the entorhinal cortex of this AD model. Therefore, our study supports the potential use of lithium as neuroprotective agent in early pharmacological AD treatments.

6. Summary

PhD Thesis - 2009

Thesis Title: *NEURODEGENERATIVE PROCESS IN THE ENTORHINAL CORTEX OF PS1_{M146L}XAPP_{751SL} TRANSGENIC MODEL OF ALZHEIMER'S DISEASE.*

Author (PhD Student)

INÉS MORENO GONZÁLEZ - 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 Supervisor

Prof. Dr. Antonia Gutierrez

Associate Professor of Cell Biology at Malaga University, Spain

Contact Information

Inés Moreno González

Email: inesmoreno@uma.es

Phone: 34-952131935

Address: Dept. Biología Celular. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga. Teatinos 29071. Málaga, Spain

Dr. Antonia Gutiérrez Pérez

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 an Aventis grant (2003-2006), by grants PI030214 (2003-2006) and PI060516 (2006-2009) from Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS / Carlos III Health Institute) and by CIBERNED (2007-2009) from Carlos III Health Institute, Spain. Inés Moreno was sponsored by FIS and Aventis PhD Fellowships and by a CIBERNED contract.

Publications in peer-reviewed journals:

1. 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 Disease** (2009) (in press).
2. Jimenez S, Baglietto-Vargas D, Caballero C, Moreno-Gonzalez I, Torres M, Sanchez-Varo R, Ruano D, Vizuite M, Gutierrez A, Vitorica J. *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.* **Journal of Neuroscience** (2008) 45:11650-11661.
3. Caballero C, Jimenez S, Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Gavilan MP, Ramos B, Del Rio JC, Vizuite M, Gutierrez A, Ruano D, Vitorica J. *Inter-individual variability in the expression of the mutated form of hPS1M146L determined the production of A β peptides in the PS1xAPP transgenic mice.* **Journal of Neuroscience Research** (2007) 85; 787-797.
4. Gavilan M, Revilla E, Pintado C, Castaño A, Vizuite M, Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Vitorica J, Gutierrez A, Ruano D. *Molecular and cellular characterization of the age neuroinflammatory process occurring in normal rat hippocampus: potential with the loss of somatostatin GABAergic neurons.* **Journal of Neurochemistry** (2007) 103(3):984-96.
5. Ramos B, Baglietto-Vargas D, del Rio JC, Moreno-Gonzalez I, Santa-Maria C, Jimenez C, Caballero C, Lopez-Tellez JF, Khan Z, Ruano D, Gutierrez A, Vitorica J. *Early neuropathology of Somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1xAPP transgenic model of Alzheimer's disease.* **Neurobiology of Aging** (2006) 27(11):1658-1672.
6. Montero F, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, Lopez-Tellez JF, Cuesta-Muñoz AL, Gutierrez A, Aledo JC. *Glutaminase activity is confined to the mantle of the islets of Langerhans.* **Biochemie** (2007) 89(11):1366-71.
7. Baglietto-Vargas D, Lopez-Tellez JF, Moreno-Gonzalez I, Gutierrez A, Aledo JC. *Segregation of two glutaminase isoforms in Langerhans islets.* **Biochemical Journal** (2004) 381; 483-487.

6.1. Abstract

Accumulation of extracellular amyloid-beta ($A\beta$) deposits, intracellular formation of 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 vulnerable brain regions (Braak and Braak, 1991). The entorhinal cortex is early affected in the disease progression by NFTs and $A\beta$ deposits, and then these lesions spread to hippocampus and neocortical areas. Moreover, the earliest neuronal cell loss is detected in the entorhinal cortex (Gomez-Isla et al., 1996). As a key component of cortico-hippocampal networks, the entorhinal cortex plays an important role in memory processes. Superficial entorhinal 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 of the entorhinal cortex (for review see Canto et al. 2008). In addition, there are substantial intrinsic connections between deep and superficial layers (Chrobak and Amaral, 2007; Insausti and Amaral, 2008; Canto et al., 2008). Then, early pathological changes within the entorhinal cortex impair this continuous information transfer and contribute to the decline of cognitive functions in early phases of AD (DeToledo-Morrell et al., 2004; Stoub et al., 2006).

In AD, it is known that certain subpopulations of neurons are particularly vulnerable to the disease process, the entorhinal cortex the most vulnerable (Price et al., 2001; Gomez-Isla et al., 1996). To study AD-related pathology and the mechanisms underlying neurodegeneration, mice expressing pathogenic mutations of human genes associated with the familial forms of AD are widely used. However, most of these transgenic (tg) mice fail to display neurodegeneration at early ages besides prominent $A\beta$ accumulation, either intracellular or extracellular. We have previously reported the early and selective vulnerability of SOM/NPY interneurons in the hippocampus of a double PS1xAPP tg mouse (Ramos et al., 2006). These mice developed $A\beta$ plaques since early ages (Blanchard et al., 2003; Caballero et al., 2007), however no significant hippocampal principal cell neurodegeneration was detected until 17-18 months of age (Ramos et al., 2006; Caballero et al., 2007; Schmitz et al., 2004). 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 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 (Jimenez et al., 2008). In this sense, at early ages the activated microglial cells displayed an alternative phenotype that could explain the limited neuronal loss, however at advanced ages activated microglia exhibited a classical cytotoxic phenotype that could, probably, be responsible of the principal cell death in this model.

In the present PhD thesis, we have now analyzed the vulnerability of entorhinal neurons to $A\beta$ pathology at early ages in this PS1xAPP mouse model. We demonstrated by stereological analysis that PS1_{M146L}xAPP_{751SL} tg mice entorhinal cortex exhibited significant decrease in the cell density of principal cells (27%) and SOM/NPY interneurons (56-46%) at

the age of 6 months. Principal neuronal death occurred selectively in the deep layers (primarily in layer V) whereas SOM/NPY cell loss was evenly distributed in superficial and deep layers. No changes in PV-positive interneurons were detected. Interestingly, pyramidal layer V neurons and SOM/NPY interneurons do not accumulate intracellular A β indicating that extracellular factors were preferentially implicated in this selective neurodegeneration. Amyloid deposits were mainly concentrated in deep entorhinal layers, and of significant relevance was the existence of inflammatory response with potential cytotoxic profile at these early ages (TNF α , TRAIL, FAS and iNOS mRNAs were significantly up-regulated at 4-6 months of age). Moreover, non-plaques associated activated microglial cells and reactive astrocytes expressed TNF- α and iNOS, respectively. These findings, together with the lack of intracellular A β in interneurons and deep principal cells, strongly support extracellular amyloid and/or neurotoxic inflammatory process as major contributors of the early entorhinal neuronal loss in this AD model. Finally, chronic oral lithium treatment prevented this early neurodegeneration in PS1xAPP entorhinal cortex; however, the molecular mechanism(s) underlying this neuroprotective effect remains to be investigated.

6.2. Literature Outline

Alzheimer's disease 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. The proportion of the elderly people is growing, and the prevalence and incidence of AD have been shown to increase exponentially with age. It is affecting about 10% of the population over the age of 65 and the frequency increases to nearly 50% by the age of 80. AD is an etiologically heterogeneous, multifactor disease. A small proportion of AD cases show an autosomal dominant transmission of the disease, and currently mutations in the genes encoding amyloid precursor protein (APP), presenilin I (PS1) and presenilin II (PS2) have been characterised in early onset familial AD cases. Mutations in each of these genes also result in elevated levels of A β , a proteolytic processing fragment of the APP, which is deposited in the brains of AD patients.

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. The memory centre hippocampus 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 microscopical lesions are amyloid plaques and neurofibrillary tangles (NFT), which are found significantly more often in AD compared to normal aging. The senile plaques are extracellular deposits of A β with a dense central core, surrounded by dystrophic neurites, indicating that a neurodegenerative process is taking place. NFTs are abnormal, filamentous inclusions found in the cell bodies of neurons primarily composed of abnormally phosphorylated tau. Tau, a microtubule-associated protein, forms paired helical filaments upon hyperphosphorylation, which leads to impaired axonal transport and eventually cell death (see review Brandt et al., 2005). Other AD lesions include neuronal loss, synaptic alterations, amyloid angiopathy and inflammation. The exact

mechanism of cell death in AD is unknown. In contrast to neurons, there is an increase in the number of glial cells found especially near amyloid plaques. Inflammation in AD brain is characterized by activated microglia associates with A β deposits and up-regulation of many mediators of inflammatory responses (McGeer and McGeer, 2007).

6.2.1. Cellular biology of amyloid- β precursor protein (APP)

The A β peptides are derived from the A β precursor protein (APP). APP is a type I transmembrane protein with a long extracellular amino terminal and a short cytoplasmic tail. Due to alternative splicing, eight different isoforms of APP exist, of which three predominates in the brain (APP695, APP751 and APP770). Neurons mainly produce APP695, which is present in the dendrites, cell bodies and axons of neurons, whereas non-neuronal cells express APP751 and APP770. The main difference between these variants, except being produced by different cells-types, is that the longer variants contain a Kunitz-protease inhibitor domain. This indicates a possible function of APP, or a soluble APP fragment, as a protease inhibitor. Apart from this assumption, little is known about the function of APP, although it has been suggested to work as a receptor, to stimulate neurite outgrowth and/or to have adhesive properties (Evin and Weidemaann, 2002).

6.2.2. APP processing

APP is synthesized in the endoplasmic reticulum (ER) and matured by post-translational modifications in the Golgi, where it is tyrosine-sulfated and O- and N-glucosylated. APP is transported from the cell body to the axon by fast anterograde transport. Both during and after the trafficking through the secretory pathway, APP can undergo proteolytic cleavage by different secretases via two different pathways. Alpha-secretase processing occurs at or close to the plasma membrane and precludes A β formation, as this enzymatic activity cleaves within the A β domain of APP, between aminoacid 16 and 17 of the A β sequence. This releases a large N-terminal fragment alphaAPPs, and a membrane-retained C-terminal fragment, C83. Further cleavage of C83 by the gamma-secretase complex in the endocytic pathway yields to non-amyloidogenic peptide p3, hence this is called the non-amyloidogenic pathway. This is the predominant pathway of APP processing, especially in peripheral cells, where alpha-secretase cleavage is more common than in neuronal cells. Cell surface APP that escapes alpha-secretase cleavage is internalized into endosomes, where it can be processed by beta-secretase at the N-terminus of the A β domain, releasing a soluble N-terminal fragment and a membrane-bound C-terminal fragment, C99. Subsequent cleavage of C99 by gamma-secretase generates A β peptides of 4kDa, mainly in the Golgi/trans-Golgi network and ER but also to some extent at the plasma membrane and in endosomes. A β production has been suggested to occur mainly in so-called lipid rafts, special assemblies of sphingolipids and cholesterol within the membrane (see reviews Selkoe, 2001 and 2008).

6.2.3. APP mutations

Although the majority of AD cases are sporadic there are many pathogenic mutations identified within the APP gene (for updated list of AD mutations see www.alzforum.org/res/com/mut/default.asp). All mutations reported so far are located at, or close to, the cleavage sites, thereby affecting APP processing. These lead either to an increased production of total A β , as in the case of the Swedish mutation (K670N/M671L), or to a switch towards an increased production of the more fibrillogenic A β_{42} peptide, which is true for the APP mutations near to the gamma-secretase site and also for mutations in the presenilin genes (PS1 and PS2). APP mutations linked to disease have also been found within the A β domain, near the cleavage site for alpha-secretase.

6.2.4. Amyloid- β peptide

Generation and Clearance

Initially, A β was thought to exist only as constituents of insoluble amyloid deposits in AD brain. Soon it was shown that A β was produced also under normal metabolic conditions, but if A β has a physiological role, it remains to be identified. A β peptides of various lengths are generated from APP following proteolytic cleavage by β - and γ -secretase, and the most commonly produced forms are the 38-, 40- and 42- aminoacid long variants, where A β_{42} is the most amyloidogenic form and the variant of A β that is linked to the disease. Most of the A β produced is secreted from the cell, although some A β remains within the cells, especially A β generated in the ER/intermediate compartment. Only 5-10% of secreted A β is A β_{42} , instead A β_{42} seems to be retained within the cells where it oligomerizes and accumulates as an insoluble pool.

In general, A β peptides are thought to be cleared from the brain by three different mechanisms: (1) enzyme mediated degradation, (2) transport of the vascular system or (3) receptor mediated endocytosis followed by endosomal-lysosomal proteolysis. However, the primary mechanism of A β clearance is thought to be degradation by extracellular peptidases. The major enzymes involved in A β catabolism are IDE and neprilysin, although other candidates as endothelin-converting enzyme and angiotensin-converting enzyme have also been shown to degrade A β .

Oligomerization and Fibrillization

A β is prone to self-aggregate and form A β fibrils, particularly the C-terminal extended variants e.g. A β_{42} . A β fibrillogenesis is a nucleation-dependent process. Once a nucleus has formed, further addition of monomers is thermodynamically favourable, leading to the formation of oligomers and ultimately fibres. During amyloidogenesis, A β undergoes a conformational shift from being mainly alpha-helical and random coil to a beta-sheet structure. Electron microscopy of A β fibrils has shown that they are straight unbranched and with a diameter of 7-12 nm. As all amyloid, A β fibrils are stained, due to their beta-sheet structure, with the dyes Congo red and Thioflavine. These dyes are commonly used for identification and staining of amyloid. Since amyloid plaques are extracellular lesions, it was

first thought the A β aggregation takes place outside cell. However, several studies have shown intracellular A β accumulation suggesting that aggregation begins already within the cell.

During in vitro A β fibrillogenesis different stable intermediates are generated ranging from 8 kDa to over 100 kDa, e.g. low molecular weight A β (LMW-A β), A β -derived diffusible ligands (ADDLs) (Lambert et al., 1998), A β globulomers, A β *56 (Lesné et al., 2006), A β oligomers, A β spheroids and protofibrils. Several studies have demonstrated that A β oligomers are neurotoxic, able to inhibit long term potentiation and disrupt cognitive function. It has therefore been argued that A β fibrils might not be the most significant A β variant for AD pathogenesis. For this reason, it is of high importance to learn more about soluble A β oligomers as targets for AD therapy.

6.2.5. Amyloid- β toxicity

A β peptides have been shown to be neurotoxic in vitro and in vivo, and it is widely believed that A β deposits directly contribute to the progressive neurodegeneration observed in AD. It has been suggested that the A β peptides exert neurotoxic effects either directly or by enhancing neuronal vulnerability to excitatory amino acids. It was first reported that it was the aggregated form of A β that was directly toxic to cultured neurons, and later it was shown that protofibrils of A β as well were neurotoxic (Lambert et al., 1998; Walsh et al., 1999). These protofibrils are neither small oligomers nor full-fledged aggregates, but rather intermediates of A β on their way from monomeric A β forming aggregates. Recently, also soluble oligomers of A β were shown to be toxic and even suggested to be the most toxic form of A β (Klein et al., 2001; Walsh et al., 2002). Soluble dodecameric assemblies of A β have recently been suggested to be the complex responsible for the memory loss observed in AD at early stages (Lesné et al., 2006). The findings that levels of soluble A β rather than insoluble A β fibrils, correlate better with AD severity suggest that non-fibrillar A β may be the toxic agent.

It has been suggested that A β exert its toxic effect and cause neuronal degeneration by acting through a cell membrane receptor to stimulate intracellular processes, including the hyperphosphorylation of tau, leading to neurodegeneration. Other studies suggest that A β itself, not through any receptor, is capable of producing free radicals and reactive oxygen species or can cause a harmful elevation of intracellular calcium levels. Intracellular A β has been observed in differentiated cell lines and some tg mice.

6.2.6. The amyloid cascade hypothesis

The amyloid cascade hypothesis was proposed shortly after the initial genetic discoveries of APP mutations leading to familial AD. The model states that abnormal aggregation of A β is initiating AD pathology and that neurofibrillary tangles, cell loss, inflammation, neurotransmitter deficiencies, and dementia follow as a direct result of this process. For several years it was debated whether tangles or plaques initiated the pathological process. Actually, several findings have strengthened the amyloid cascade hypothesis immensely and it is today the most favoured model to explain the pathogenic

events leading to AD. Although plaque burden has been shown to correlate with degree of dementia in some studies, there are studies that have been unable to find such a correlation. Therefore, it has lately been debated whether AD pathology is the result of the insoluble A β in the plaques, since it has been shown that soluble A β , defined as non-fibrillar A β , e.g. monomers and oligomers, correlates better than amyloid deposits to the degree of dementia (see review Haass and Selkoe, 2007).

6.2.7. Inflammation in Alzheimer's disease

Compelling evidence gained over the last decade has supported the idea that inflammation is associated with AD development and pathology (Griffin et al., 1998; Akiyama et al., 2000; McGeer and McGeer, 2001; Mrak and Griffin, 2005; Tuppo and Arias, 2005; Wojtera et al., 2005; Wyss-Coray, 2006; Griffin, 2006; Heneka and O'Banion, 2007; Mrak et al., 2007; Venneti et al., 2008). In fact, already in 1907, Alois Alzheimer noticed signs of an inflammatory reaction in the dementing diseases he described (Alzheimer, 1907). Inflammatory conditions such as head trauma and infection have been reported as potential risk factors for AD. Epidemiological studies have shown that chronic use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) significantly decreased the risk of developing AD, suggesting a correlation between inflammation and AD. Hence, brain inflammation has become one of the major focuses for AD research. The role of inflammation in AD though is yet to be elucidated, whether it is a secondary process or directly contributes to the disease process is still unclear. The major players involved in the inflammatory process in AD are thought to be microglia and astrocytes. A β has been shown to attract and activate microglia leading to clustering of these cells around A β deposits pointing to a phagocytic attempt by microglia to remove A β . Failure of microglial A β clearance has been proposed to contribute to AD pathology. Activation of microglia and astrocytes by A β also leads to an increased secretion of pro-inflammatory cytokines like IL-1 β and IL-6, as well as chemokines and complement factors. In addition, activated microglia also produces oxygen and nitrogen free radicals. Thus, microglia may play an important role in AD pathogenesis. In vivo imaging studies have shown that accumulation of activated microglia in AD pathology brain areas occurs at a relatively early stage of the disease process, probably before neurodegenerative changes occur. In the entorhinal and frontal cortex, activated microglia showed a higher correlation with synapse loss than NFTs and A β deposits (Lue et al., 1996) suggesting that activated glial cells might be a prime inducer of the neuronal damage that takes place in AD.

Since the microglia and the astrocytes can have both neuroprotective functions, by degrading extracellular A β and secrete neurotrophic factors, and neurodegenerative functions, by secreting pro-inflammatory cytokines and cytotoxic agents, it is difficult to determine their role in the AD process. It is possible that microglia and astrocytes exhibit different roles in plaque evolution. In this sense, we have recently determined the *in vivo* inflammatory response in the hippocampus of PS1xAPP tg mice from a wide age range (from 2 to 18 months) (Jimenez et al., 2008). At early ages (6 months), we have observed the activation of microglial cells to an alternative phenotype with phagocytic capabilities (neuroprotective), exclusively, surrounding the A β plaques. However, at older ages (18 months), the

accumulation of extracellular oligomeric A β produced marked widespread microglial activation toward a classic phenotype and the production of cytotoxic factors (TNF α , FasL, TRAIL, COX2 and NOX1), that was coincident with extensive pyramidal neurodegeneration.

6.2.8. Entorhinal Cortex

The entorhinal cortex, which is involved in neural systems related to memory, is selectively degenerated in early Alzheimer's disease. In fact, the earliest neuronal cell loss is detected in the entorhinal cortex (Gomez-Isla et al., 1996). Amyloid plaques appear in an early stage of AD in the temporal neocortex, the entorhinal cortex and the hippocampus (Braak and Braak, 1991; Duyckaerts, 2004; Thal et al., 2000, 2002). Neurodegeneration of the entorhinal cortex likely plays a major part in the memory dysfunction observed at early stages of AD (DeToledo-Morrell et al., 2004; Stoub et al., 2006). The entorhinal cortex relays multimodal processed information from the sensory cortical areas to the hippocampus, as well as information processed by the hippocampus to permanent storage sites in the neocortex (Heinemann et al., 2000; Poucet et al., 2003), and as such is assumed to play an important role in memory processes.

The entorhinal cortex (Brodman area 28) derives its name from the fact that it is partially enclosed by the rhinal (olfactory) sulcus. For detail review, see Canto et al., 2008. A number of cortical areas surround the entorhinal cortex. Anteriorly, it meets with olfactory and amygdaloid cortices, such as the piriform (olfactory) cortex laterally, and medially the periamygdaloid cortex and the posterior cortical nucleus of the amygdala border it. On its medial side, the entorhinal cortex merges with structures that belong either to the hippocampal formation or the parahippocampal region, such as the amygdalo-hippocampal transition, and the parasubiculum. The lateral and posterior borders are with the other two major constituents of the parahippocampal region, the perirhinal cortex laterally and the parahippocampal cortex (in non-primate species generally referred to as postrhinal cortex) posteriorly. The lateral and posterior borders are quite easy to establish based on a variety of cytoarchitectonic and chemoarchitectonic features. The entorhinal cortex is a major input and output structure of the hippocampal formation, entertaining the role of the nodal point of cortico-hippocampal circuits. Superficial layers receive convergent cortical information, which is relayed to structures in the hippocampus, and hippocampal output reaches deep layers of entorhinal cortex, that project back to the cortex.

Cortical neurons can be broadly classified into two categories. Principal neurons project to targets outside the cortical area of origin, whereas non-principal cells or "interneurons" provide radial and tangential communication between various cortical layers. The general population of interneurons in the cortex is thought to be inhibitory, utilizing γ -aminobutyric acid (GABA) as its neurotransmitter (for review see DeFelipe, 2002). Morphologically, interneurons in the cerebral cortex are quite heterogeneous. Interneurons are commonly classified by their expression of two types of molecular markers: calcium-binding proteins and neuropeptides. The calcium-binding proteins parvalbumin (PV), calbindin (CB) and calretinin (CR) are reasonably reliable markers of interneurons and many in the hippocampus and neocortex express at least one. In those regions, PV⁺ interneurons

Summary

tend to be perisomatic-targeting cells, whereas CB^+ and CR^+ interneurons are often dendrite targeting. The best-characterized interneuron neuropeptides are somatostatin (SOM), cholecystokinin (CCK), neuropeptide Y (NPY) and vasoactive intestinal peptide (VIP). The SOM^+ interneurons in the neocortex are mainly dendrite targeting, whereas the CCK^+ interneurons in the hippocampus mainly target the soma.

The lamination of the entorhinal cortex generally is considered the prototype of the transition between the three-layered allocortex and the six-layered neocortex. The superficial plexiform or molecular layer (layer I) is relatively free of neurons and, in general, contains a dense band of transversely oriented fibres. The outermost cell layer (layer II) varies considerably in appearance among the rostro-to-caudal and lateral-to-medial extent, but mainly contains so-called “stellate” or “modified pyramidal cells.” Overall, cells in layer II are fairly large, making them distinctly different from layer II cells in the adjacent cortical regions with the exception of the parasubiculum. In the latter area, neurons of layer II are as large as or somewhat larger than those of the entorhinal cortex, but entorhinal cells stain darker with a Nissl stain. Layer III is a wide layer of loosely arranged, large to medium sized cells that are predominantly of the pyramidal type. The deep border of layer III is the cell-sparse fibre layer called the lamina dissecans (sometimes referred to as layer IV). The lamina dissecans is better developed in the medial entorhinal cortex although species differences are apparent. The next cell layer (layer V) is clearly stratified. Sometimes, it is subdivided into a superficial layer of large to medium-sized, darkly stained pyramidal cells, which is sometimes referred to as layer Va. Note that, in some lamination schemes, more particularly so in primates, this layer is referred to as layer IV. Thus resulting in some confusion when compared to the present scheme where the lamina dissecans is referred to layer IV. Subsequent deeper portions of layer V have an overall stratified appearance and mainly consist of rather small pyramidal cells with a moderately dense packing. In the deepest cell layer VI, which is delineated by the white matter, multiple layers can be distinguished, more in particular in primates. However, since the appearance of layer VI is highly variable at different lateromedial and rostrocaudal levels, generally no further differentiation between sublayers is made.

In the last decade, multiple lines of tg mice over-expressing one or more of these familial AD linked genes have been created (Morrisette et al., 2009; McGowan et al., 2006). Although none of the mouse models recapitulates all aspects of AD, several lines do develop robust AD-like pathology, including $A\beta$ containing plaques surrounded by phospho-tau containing dystrophic neurites, synaptic damage, and age-related learning and memory deficits. These tg mouse models have provided new opportunities to investigate the biochemical and cellular mechanisms underlying this devastating neurodegenerative disorder, and have helped identify the link between elevated $A\beta$ and synaptic dysfunction. Unbiased, stereological neuronal counting has established that APP and PSAPP mouse models, despite extensive amyloid deposition in some lines, do not have widespread neuronal loss as seen in AD. We have previously reported a selective neuronal loss (SOM/NPY interneurons) in the hippocampus of a PS1xAPP model at early ages (Ramos et al., 2006), whereas pyramidal degeneration occurs at late ages (18 months).

6.3. Aims of the study

So far, there is no cure for Alzheimer's disease. The disease progresses invariably and leads to severe impairment and finally death. The typical neuropathological changes occurring in AD were described more than hundred years ago, however still today detection and analysis of these changes must be done from an autopsied brain before one can come to a definite diagnosis of AD. In particular, the clinical diagnosis of AD in its very early stage is complicated, but important, because the current symptomatic therapy and most likely future therapies would be predicted to have their best efficacy during the early stages of the disease. An effective treatment should arrest, or even slow, the neurodegenerative process before severe memory and cognitive impairments develop. Therefore, a major issue in the treatment and care of AD patients is a requirement for animal models and biomarkers to aid early stage identification and accurate diagnosis, and to measure treatment efficacy.

A relatively high number of PS1, APP, PS1xAPP or PS1xAPPxTau tg mice has been generated as valuable models of AD. Most AD models have been designed to mimic the A β depositions observed in patients, since compelling evidences indicated the A β neurotoxicity as the principal cause of all AD cases (Hardy and Selkoe, 2002). However, these tg mice reproduced most, but not all, aspects of AD. In this sense, APP or PS1xAPP tg mice displayed A β accumulation, neuritic alteration and behavioural and cognitive deficiencies but not the massive neuronal loss characteristic of the human disease. The phenotypic characterization of the different AD models is a preliminary, but relevant, goal in the study of the AD progression, the identification of new therapeutic targets and the development of new pharmacological approaches against this devastating illness.

*1. The **first objective** of this work is to establish whether specific neuronal populations are particularly vulnerable at early ages in the entorhinal cortex of this PS1xAPP model. The pathological evolution of major interneuronal populations (SOM/NPY-positive cells, PV-positive cells and CR-positive cells) as well as the early vulnerability of the principal cells will be analyzed.*

The earliest neuronal cell loss is detected in the entorhinal cortex of AD brains (Gomez-Isla et al., 1996). However, most of AD models fail to display neurodegeneration. We have previously observed a selective vulnerability of the hippocampal SOM/NPY system in the hippocampus of the PS1xAPP model (Ramos et al., 2006). At 6 months of age, hippocampal SOM/NPY interneurons were significantly reduced (60%). Thus, in this work we have specially focused on entorhinal SOM and NPY expressing interneurons. The loss of SOM and/or NPY in AD patients is a well-reproduced observation. In this sense, the existence of a reduction in the number of cortical SOM/NPY immunopositive cells (Davies et al., 1980; Chan-Palay et al., 1987), the SOM/NPY content in diverse brain areas (Davies et al., 1980) and in cerebrospinal fluid (Nilsson et al., 2001) has been described. In fact, as mentioned by Saito et al. (Saito et al., 2005), SOM is one of the few transcripts (0.5%) that consistently reduced in aged human brains (Lu et al., 2004). It has been demonstrated the implication of SOM neuropeptide in the acquisition of spatial maps and learning induced by

novel environments (Baraban and Tallent, 2004). Thus, the high cellular vulnerability together with its implication in memory processes makes this particular neuronal population a good candidate to be preferentially affected at early stages of the AD and in AD models.

*2. The **second objective** of this work is to analyze the spatial and temporal A β expression in the entorhinal cortex of this PS1xAPP model and its possible implication on neurodegeneration. The expression (intracellular/extracellular) of A β and different forms (A β 1-40, A β 1-42, oligomeric and fibrillar) will be analyzed from 2- to 18-months of age.*

The entorhinal cortex, which is first severely affected in AD, is well known for its involvement in cognitive processes. Today, the “amyloid cascade hypothesis” is the most prominent of the many theories proposed over the years to explain the pathogenesis of AD. It states that the A β peptide acts to drive the neurodegenerative processes that cause AD and that the rest of the disease process results from an imbalance between A β production and clearance. The amyloid cascade hypothesis is at present the most dominant theory to explain the pathogenesis of AD. The early apparition of A β depositions in this AD model might drive entorhinal neurodegeneration and it is plausible that the different neuronal populations displayed a different vulnerability to the A β depositions.

*3. The **third objective** of this work is to analyze the inflammatory process associated to the A β deposition in the entorhinal cortex of PS1xAPP model and its possible implication on neuronal survival and/or death.*

As proposed by the inflammation hypothesis of AD, the neurodegenerative process could be exacerbated by a chronic inflammatory response A β peptides (Griffin et al., 1998; Wyss-Coray, 2006; Heneka and O' Banion, 2007 for reviews). In fact, secondary to A β accumulation, there is an inflammatory response characterized by activated microglia and reactive astrocytes surrounding extracellular deposits of these peptides. Activated inflammatory cells could mediate neuronal damage by the release of toxic products such as inflammatory cytokines, excitatory amino acids, reactive oxygen intermediates and other cytotoxic factors (Mrak and Griffin, 2005; Craft et al., 2006; Zipp and Aktas, 2006). This was further emphasized by a number of clinical studies demonstrating that the symptoms of AD could be prevented or attenuated by non-steroidal anti-inflammatory drugs (Aisen, 2000; McGeer and McGeer, 2007). However, other clinical trials have not confirmed this positive effect (Aisen et al., 2003; Reines et al., 2004).

Although a deleterious inflammatory reaction could indeed mediate the neurodegeneration observed in AD, a completely different possibility is just beginning to consider, supporting a trophic and pro-regenerative role of the inflammatory response. Activated glial cells are also capable of secrete anti-inflammatory cytokines (Butovsky et al., 2006), as well as growth and neuroprotective factors that may, ultimately, protect against AD pathology (Streit, 2005). In this sense, vaccination against the A β peptides led to activation of microglia and successfully decreased amyloid load (Wilcock et al. 2003; Wilcock et al., 2004a; Wilcock et al., 2004b). Similarly, stimulating the immune system with LPS led to a reduction in A β plaques (DiCarlo et al., 2001; Herber et al., 2004). Based on these data, a

human clinical trial was begun peripherally administering a synthetic A β 1–42 peptide (AN-1792) to AD patients. Unfortunately, this trial was halted because 6% of patients developed aseptic T-cell meningoencephalitis. Therefore, adjust the nature of the glial response to A β may be of therapeutic benefit in AD. Nevertheless, little information about the balance between pro- and anti-inflammatory events occurring in AD or about the cellular and temporal induction of inflammatory cascade by A β is known. We have recently reported the *in vivo* inflammatory response in the hippocampus of this AD model (Jimenez et al., 2008). Briefly, at early ages, activated microglial cells were found exclusively surrounding A β plaques and displayed an alternative phenotype with neuroprotective features. However, at older ages, microglial activation was expanded to interplaques areas and showing now a classical phenotype with neurotoxic features (expressing TNF- α and related factors). Classical activation coincided temporally with pyramidal neurodegeneration.

4. *The **last objective** of this work was to analyze the effect of dietary lithium treatment on neuronal survival in the entorhinal cortex of this AD model.*

Accumulating evidence supports the notion that lithium is neuroprotective against a variety of insults in both *in vivo* and *in vitro* experimental settings (Chuang, 2005). The neuroprotective mechanisms are complex, and likely involve activation of cell signalling pathways and changes in gene expression of proteins critically involved in neuronal survival. Lithium is known to be inhibitor of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). Inhibition of this enzyme likely causes a cascade of events, leading to neuroprotective and neurotrophic actions. Abnormal accumulation of products of the A β precursor protein (APP) metabolism might play a central role in the pathogenesis of AD. Although the precise mechanisms through which APP products might result in neurodegeneration in AD are not completely clear, alterations in signalling pathways involved in neuronal survival and synaptic plasticity play an important role. Among them, the GSK-3 β pathway might play an important role because aberrant activation of this signalling molecule has been shown to modulate APP processing and tau phosphorylation. In addition, over-expression of active GSK3 β results in an AD-like phenotype in tg mice, which can be reversed by turning off GSK3 β expression under the regulatory control of a conditional promoter. Interestingly, lithium might protect against excitotoxicity by modulating the activity of GSK3 β as well as other pathways involved in neuronal survival, such as Bcl-2 (B-cell lymphoma protein 2) expression, inositol metabolism, and mitogen-activated protein kinase signalling. *In vivo* studies have shown that lithium reduces the AD-like neuropathology. For example, lithium has been shown to reduce A β production and amyloid plaque load in human hAPP tg mice. Moreover, lithium has been shown to decrease tau phosphorylation in tau tg mice (Nakashima et al., 2005; Noble et al., 2005). The mechanisms through which GSK3 β inhibitors are protective and reduce A β products are not completely clear.

On the other hand, the therapeutic efficacy of lithium may be mediated also by clearance of very long half-life autophagy substrates that may contribute to the disease. Autophagy is a general term for the degradation of cytoplasmic components within lysosomes. This process is quite distinct from endocytosis-mediated lysosomal degradation

Summary

of extracellular and plasma membrane proteins. Autophagy is mediated by a unique organelle called the autophagosome. As autophagosomes engulf a portion of cytoplasm, autophagy is generally thought to be a non-selective degradation system. This feature is in marked contrast to the ubiquitin–proteasome system, which specifically recognizes only ubiquitinated proteins for proteasomal degradation. Autophagy is critical to the health of neurons, and its loss in the central nervous system is involved in age-related neurodegeneration. Defects in autophagy are seen in AD, and may be linked to enhanced accumulation of A β peptides (see review by Nixon, 2007). Lithium can increase the clearance of aggregated proteins, including mutant *huntingtin* and mutants of *α -synuclein* through induction of autophagy by inhibiting inositol monophosphatase (IMPase). The stimulation of autophagy by lithium is thought to involve a novel mTOR-independent pathway by decreasing free inositol (Sarkar et al., 2005; Sarkar and Rubinsztein, 2006).

6.4. Materials and Methods

6.4.1. Transgenic mice

The generation and initial characterization of the PS1 and PS1 $\times$ 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 $\times$ 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.

Chronic lithium treatment. To test the neuroprotective effects of lithium in our tg model of AD-like pathology, 3 month-old PS1 $\times$ APP and PS1 tg mice were fed for 180 days with either regular rodent chow (control, n=6) or chow that contained 1.2g lithium carbonate/kg chow (n=6) (Harlan Laboratories, Inc., Indianapolis). Determination of serum lithium levels in treated mice was done at 71 (0.34 ± 0.03 mM) and 150 (0.35 ± 0.05 mM) days of treatment. This treatment was carried out by the Dr. Vitorica's group at Seville University. Animals were then decapitated and brains dissected in two hemi-brains. One hemi-brain was fixed in paraformaldehyde and tested for neuropathology (immunohistochemistry) whereas the other hemi-brain was quickly frozen and used for future biochemical studies.

6.4.2. Anatomical boundaries

The entorhinal cortex was defined according to previous studies by Van Groen (2001) for the mouse and Insausti et al. (1997) for the rat entorhinal cortex. The entorhinal cortex is medially bordered by the parasubiculum and laterally by the perirhinal cortex; rostromedially it is bordered by the piriform cortex, whereas, caudo-dorsally, 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 entorhinal layers were identified based on their cytoarchitectonic features. Each subfield has six layers: four cell layers (layers II, III, V, and VI) and two plexiform layers (layers I and IV).

6.4.3. Laser capture microdissection

Anesthetized 4- and 6-month old WT and PS1xAPP male mice (n=4/type/age) were killed by decapitation and brains were quickly removed and frozen. Brains were cut at 15µm on a cryostat. Sections were collected onto Superfrost Plus slides (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) and stored at -80 °C until use. The identification of lateral entorhinal cortex from brain sections lightly stained with hematoxylin was made according to the atlas of the mouse brain in stereotaxic coordinates (Franklin K.B.J: and Paxinos 2008). Laser capture micro-dissection was performed using a Pix-Cell II instrument from Arcturus Engineering (Mountain View, CA). Cells were captured with the 30µm laser setting and CapSure LCM Caps (Arcturus). The laser was set to a pulse of 60mW for 50ms. Entorhinal cortex was selectively captured from each section. After capture, the capture disk was cleared of non-specifically adhering tissue using a CapSure Cleanup Pad (Arcturus).

6.4.4. RNA extraction and isolation

RNA was extracted using the PicoPure RNA isolation kit. Capture disks with isolated material were micro-centrifuged 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 purified as indicated by the manufacturer. The integrity and the amount of purified RNA were analyzed using RNA 6000 Pico Assay kit (Agilent Technologies).

6.4.5. RT-PCR 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 (Ramos et al., 2006; Jimenez et al., 2008) with the following modifications. Due to the low amount of tissue sample, the cDNA was pre-amplified (see Ruano et al. 1995) before quantitative RT-PCR. 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. Denaturation at 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 probes and Master Mix (Applied Biosystems). After pre-amplification, the samples were analyzed 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 a housekeeper (beta-actin). The amplification of the

Summary

housekeeper (beta-actin) was done in parallel with the gene to be analyzed. The results were normalized using the beta-actin expression and the data were expressed respect to age-matched non-tg controls (see Jimenez et al., 2008).

6.4.6. Tissue preparation

After deep anaesthesia with sodium pentobarbital (60 mg/kg), 2-, 4- and 6-month-old control (WT), PS1 and PS1xAPP 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 40µm 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, one PS1 tg mice and one PS1xAPP tg mice).

6.4.7. Immunohistochemistry

Sections that represented 1/7th of the total entorhinal cortex from control and both tg mice (PS1 and PS1xAPP) 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, 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 immunolabelling sections, were immunoreacted with one of the 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 mouse monoclonal (1/1000 dilution, Chemicon); anti-Aβ 6E10 (1:1500 dilution; Sigma) mouse monoclonal; anti-Aβ1-40 rabbit polyclonal (1:40 dilution; Biosource); anti-Aβ1-42 rabbit polyclonal (1:40 dilution; Biosource); anti-M71/3 rabbit polyclonal (1:1500 dilution, Dr. Klein); anti-NU4 mouse polyclonal (1:2000 dilution, Dr. Klein); anti-hAPP rabbit polyclonal (1/20000 dilution; Sigma); anti-AT8 mouse monoclonal (1:5000 dilution, Pierce Biotech.); anti-CD11b rat monoclonal (1/150000 dilution, Serotec), anti-Iba1 rabbit polyclonal (1:1000 dilution, Wako); anti-GFAP chicken polyclonal (1/2000 dilution, Chemicon); anti-YM1 (AMCase) goat polyclonal (1:100 dilution, SantaCruz); anti-IGF1 rabbit polyclonal (1:500 dilution, SantaCruz), IGF1R rabbit polyclonal (1:1000 dilution, Abcam); anti-IL4 goat polyclonal (1:250 dilution, SantaCruz), anti-iNOS rabbit polyclonal (1:1000 dilution, Transduction Laboratories); anti-TNFalpha rat monoclonal (1:100 dilution; Abcam); anti-TNFR1 rabbit polyclonal (1:1000 dilution, SantaCruz); anti-CD3 hamster polyclonal (1:100 dilution, BD); anti-Bim rabbit polyclonal (1:500 dilution, Santa Cruz Biotechnology); anti-caspase3 rabbit monoclonal (1:100 dilution, Cell Signaling); anti-FaimL rabbit polyclonal (1:200 dilution, Dr. Comella); anti-EEA1 rabbit polyclonal (1:200 dilution, Affinity Bioreagents); anti-GM130 rabbit polyclonal (1:500 dilution, Abcam); anti-GRP94 rabbit

polyclonal (1:2000 dilution, Abcam) or anti-LAMP2 rabbit polyclonal (1:50 dilution, Abcam) 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. 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 SOM/NeuN immunoperoxidase labelling, sections were first immunolabelled with anti-SOM using DAB/nickel to visualize the reaction product (blue product), and then processed for NeuN immunostaining using only DAB as chromogen (brown product). For double SOM/NPY, VGAT/hAPP, VGlut/hAPP, hAPP/6E10, Nu4/hAPP, GRP94/Nu4, GM130/Nu4, TGN38/Nu4, EEA1/Nu4, LAMP2/Nu4, GFAP-6E10, GFAP-iNOS, IGF1/SOM, IGR1R/GFAP, CD3/IL4 and GFAP/IL4 immunofluorescence labellings, sections were first sequentially incubated with the indicated primaries antibodies followed by the corresponding Alexa488 secondary antibody (1:1000 dilution; Invitrogen) and by the biotinylated secondary antibody (1:500; Vector Laboratories) and streptavidin-conjugated Alexa568 (1:2000 dilution; Invitrogen). For double CD11b/Thioflavin-S, 6E10/Tomato lectin, Ym1/TL, IGF1/TL or IL4-Tomato lectin, fluorescence labelling, sections were first incubated with the primary antibody followed by Alexa488 conjugated secondary antibody. Then, sections were washed and processed for Thioflavin-S staining (see below) or incubated for 1 hour with a solution of 5µg/ml biotinylated Tomato lectin (Sigma) followed by streptavidin-conjugated Alexa 568 (1:1000; Invitrogen). Sections processed for immunofluorescence were mounted onto gelatine-coated slides, coverslipped with 0.01M PBS containing 50% glycerin and 2.5% triethylenediamine. Then, sections were examined under a confocal laser microscope (Leica TCS-NT) or Olympus BX-61 microscope with epifluorescence.

For 5x multiple immunoperoxidase labelling, sections were first and sequentially incubated with anti-SOM, anti-PV, anti-CR and anti-VIP (all of them intraneuronal markers) as described above. After the DAB-nickel reaction (dark blue end product), sections were then washed and incubated 3 days with anti-NeuN monoclonal antibody (1:1000 dilution), followed by 1 h incubation with anti-mouse biotinylated IgG antibody (1:500 dilution; Vector Laboratories), and 90 min incubation with streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (Sigma–Aldrich) diluted 1:2000. This second immunoperoxidase reaction was developed with DAB only (brown reaction product). Sections were finally 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.

6.4.8. Thioflavin S staining

Free-floating sections were incubated for 5 minutes with 0.015% Thioflavin-S (Sigma) in 50% ethanol, and then washed in 50% ethanol, mounted onto gelatine-coated slides and coverslipped with 0.01M PBS containing 50% glycerine and 2.5% triethylenediamine.

6.4.9. Stereological analysis

Cell counting in the LEnt and motor cortex was done in 6-8 sections per animal through the entire rostrocaudal extent of the mouse brain. Immunopositive cells for SOM, NPY, PV or NeuN belonging to the different animal groups (WT, PS1 and PS1×APP) ($n=6/\text{age}/\text{group}$) were quantified according to the optical fractionator method, using an Olympus BX61 microscope (Olympus, Denmark) interfaced with a computer and a Olympus DP71 digital camera. The NewCAST software package from Olympus generated sampling frames with a known area and directed the motorized X-Y stage (Prior Scientific Instruments, UK), and a microcator (MT12, Germany), which monitored the movements in the Z-axis with a resolution of $0.5\mu\text{m}$. The number of LEnt neurons was quantified in every 7th section (with a distance of $280\mu\text{m}$) through the entire antero-posterior extent of the LEnt (between -2.06 mm anterior and -4.60 mm posterior to Bregman, Franklin and Paxinos, 2008). This criteria prevented counting neurons from contiguous sections. The LEnt area was defined using a 4x objective and the number of neurons was counted using a 100x/1.35 objective. We used the optical $3\mu\text{m}$ from the upper surfaces as look-up and those $3-13\mu\text{m}$ from the surfaces as reference sections. The numerical density (ND; cells/ mm^3) of immunopositive cells was estimated using the following formula: $\text{ND} = \sum Q^- / (\sum axh)$, where “Q⁻” is the number of dissector-counted somatic profiles, “a” is the area of the counting frame ($1874.2\mu\text{m}^2$) and “h” is the height of the optical dissector ($10\mu\text{m}$). The precision of the individual estimations is expressed by the coefficient of error (CE) (Gundersen et al., 1999) using the following formula: $\text{CE} = 1/Q \times (3A - 4B + C/12)^{1/2}$, 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.

6.4.10. Entorhinal cortex volume

We estimated the LEnt volume of WT and PS1×APP mice ($n=6$) applying the Cavalieri's principle in combination with point counting. This method provides efficient and unbiased volume estimation: $V = a(p) \times d \times \sum P_i$, where ‘a(p)’ is the area associated with each sampling point, ‘d’ the mean distance between two consecutively studied sections and ‘ $\sum P_i$ ’ is the sum of points hitting. From the rostrocaudal set of sections in each animal a 7th series was selected for analysis. An average of 6-7 sections was measured in each animal. The CE of the volume ranged between 0.03 and 0.07. Data demonstrated the absence of differences between WT, PS1 and PS1×APP mice.

6.4.11. Plaque Loading Quantification

Thioflavine S (T1892; Sigma) staining was observed under an Olympus BX-61 epifluorescent microscope using FITC filter and 4x objective. Images were acquired with a

Nikon DXM1200 high-resolution digital camera using the ACT-1 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/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, the level of which was maintained throughout the experiment for uniformity. The colour images were converted to a binary images with plaque 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) x 100. The sums were taken over all slides sampled and a single plaque burden was computed for each mouse. The mean and standard deviation (SD) of the plaque loading were determined using all the available data. Quantitative comparisons were carried out on sections processed at the same time.

6.4.12. 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 isotropic probes by the NewCAST software package from Olympus stereological system. Deep entorhinal layers were analyzed using a counting frame of 7528.5 μm^2 and step length of 194.02x194.02 μm . For individual plaque measurement, a 40x objective was used. Number of plaques/ mm^2 falling into four surface categories (ranging from <200 μm^2 to >2000 μm^2) was calculated. A single examiner blinded to sample identities did each analysis.

6.4.13. 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.

6.5. Results and Discussion

OBJECTIVE #1

6.5.1. The expression of SOM mRNA was selectively reduced in the entorhinal cortex of PS1xAPP at 6 months of age

We have previously reported that, at early ages, the GABAergic system is severely affected in the hippocampus of this AD model (Ramos et al., 2006). Significant loss of dendritic inhibitory SOM/NPY interneurons (OL-M and HIPP cells) was found at 6 months of age, whereas the neuronal density of perisomatic inhibitory PV-positive subpopulation did not change. We have now analyzed the vulnerability of these interneuronal subsets in the

Summary

entorhinal cortex, a brain region that also is specifically damaged by this pathology at early stages.

We have first determined the mRNA expression of specific interneuronal markers (SOM, NPY, PV and CR) using laser microdissected samples of entorhinal cortex from 4- and 6-month-old WT (control) and PS1xAPP tg mice (Fig. 3.3). As shown, the expression of SOM mRNA was specifically decreased ($26.11 \pm 13.53\%$, $n=4$; Tukey $p<0.01$) in 6-month-old PS1xAPP animals as compared to age-matched WT littermates. However, at this age no differences in the expression of NPY, PV or CR mRNAs were detected. No changes were found at 4 months of age for any of these markers. These results emphasized the specific early modification (6 months of age) on the expression of SOM neuropeptide in PS1xAPP mice entorhinal cortex.

6.5.2. The decrease in SOM mRNA was paralleled by a reduced number of SOM expressing cells in the entorhinal cortex of PS1xAPP at 6 months of age

To investigate if this early reduction in the level of SOM transcripts correlates with a reduced density of SOM-expressing cells, as seen previously in the hippocampus (Ramos et al., 2006), we have combined specific immunohistochemical detection of SOM interneurons with unbiased stereological cell counting method, in the entorhinal cortex of PS1xAPP, PS1 tg and WT mice at early ages (2-, 4-, 6-, 12- and 18-month-old). SOM-positive non-pyramidal somata were found in cortical layers II-VI of entorhinal cortex (Fig. 3.4) and showed multipolar morphology with several primary dendritic processes immunolabelled. These SOM-positive cells have profuse axonal arborisation throughout cortical layers I to IV, being denser in layer I. As expected from the RNA study, qualitative assessment of immunolabelled sections through the entorhinal cortex of PS1xAPP mice indicated a robust loss of SOM-positive cells at 6 (Fig. 3.5), 12 (Fig. 3.5) and 18 (Fig. 3.6) months of age, when compared to the age-matched WT or PS1 mice (Fig. 3.5 and 3.6). In addition, the morphological examination showed the presence of numerous SOM-positive dystrophic neurites in the double tg mice, many of them associated to A β plaques. However, no aberrant neurites were detected in PS1 tg mice or control group. The stereological study (Fig. 3.7 A) demonstrated a significant decrease in the number of SOM-positive cells (neurones/mm³) in PS1xAPP mice at 6 ($56.20 \pm 8.09\%$, $n=6$; Tukey $p<0.001$), 12 ($44.92 \pm 30.01\%$, Tukey $p<0.05$) and 18 ($53.08 \pm 12.86\%$, Tukey $p<0.01$) months of age compared to WT animals (Fig. 3.7 A). PS1 group did not showed changes compared to WT group. 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 PS1xAPP group (Fig. 3.7 B). Data demonstrated the existence of homogenous reduction of SOM-positive cells through cortical laminae ($51.51 \pm 17.30\%$ in the superficial layers vs. $51.16 \pm 19.42\%$ in the deep layers; $n=6$, t-test $p<0.005$).

To determine if this interneuronal population was more severely affected in this brain region, we have also counted the SOM-positive cells in a neocortical region (the auditory cortex) and in the striatum of the same 6-month-old PS1xAPP mice population. In the auditory cortex we found a decrease of $34.59 \pm 7.91\%$ ($n=3$; 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% depending in the subfield being CA1 ($63.9 \pm 4.6\%$ and dentate gyrus ($63.1 \pm 5.9\%$) the most affected ones (Ramos et al., 2006). Therefore, SOM-positive cells are preferentially affected in both regions, the hippocampus and entorhinal cortex, first and severely affected also in AD patients.

6.5.3. The loss of SOM and/or NPY interneurons is probably due to a neurodegenerative process in this PS1xAPP model

The decrease in the number of entorhinal SOM/NPY-expressing cells probably reflects the loss of these interneurons, most likely Martinotti cells (Wang et al., 2004), rather than a decrease in SOM and NPY protein expression. To address this question, we have performed double labelling with SOM and NeuN (neuronal marker) in PS1xAPP, PS1 and WT animals of 6 months of age. Surprisingly (Fig. 3.8), an evident over-loss of NeuN-labelled cells, mainly located in the infragranular layers, was observed in PS1xAPP animals (Fig. 3.8 D vs. F). As shown in Fig. 3.9, stereological cell counting revealed in PS1xAPP animals a loss of 6394 neurons/mm³ (difference calculated from WT) for entorhinal SOM population whereas there was a loss of 25788 neurons/mm³ for NeuN-labelled cells ($-27.16 \pm 7.39\%$, $n=4$, t -test $p < 0.05$). No significant changes between PS1 and WT groups were found. Thus, the loss of NeuN-labelled cells seemed to exceed the reduction in the number of SOM-positive cells. These data could indicate that principal cells might be also preferentially affected in the entorhinal cortex at early ages in this AD model.

6.5.4. A significant decrease in the number of NPY-positive interneurons at early ages in the entorhinal cortex of PS1xAPP

In the hippocampus of this model, the most damaged population was the SOM interneurons that also co-expressed NPY neuropeptide (Ramos et al., 2006). Extensive co-localization of SOM and NPY was also reported in the cerebral cortex (Vincent et al., 1982; Hendry et al., 1984b; Chronwall et al., 1984; Chan-Palay, 1987; Papadopoulos et al., 1987). Therefore, we analyzed the NPY-positive population by immunohistochemistry. As shown, Fig. 3.10, NPY-immunoreactivity was present in non-pyramidal cell bodies and fibres in all layers of the entorhinal cortex. NPY-immunoreactivity was found within neuronal somata whereas proximal dendrites were usually weakly immunolabelled (see Fig. 3.10 E). The number of NPY-positive somata, observed in control animals, was clearly inferior when compared to SOM-positive somata (see Fig. 3.10 vs. Fig. 3.4). On contrary to mRNA expression study, the qualitative assessment of sections immunolabelled with anti-NPY revealed that the entorhinal cortex of 6 (Fig. 3.11 A-C), 12 (Fig. 3.11 D-F) and 18 (Fig. 3.12 A-C) month-old PS1xAPP mice contained less number of NPY-positive somata than WT or PS1 animals. Moreover, these PS1xAPP mice showed a high number of dystrophic NPY-positive neurites, most of them associated to amyloid deposits, similar to that seen for SOM cells (see inset in Fig. 3.11 C).

The stereological analysis (Fig. 3.13) demonstrated a significant reduction in the number (neurons/mm³) of NPY-positive cells in PS1xAPP mice at 6 (46.36%±14.17%, n=4; Tukey p<0.05), 12 (39.77±21.52%, Tukey, p<0.05) and 18 (50.41±22.46%, Tukey, p<0.01), when compared to age-matched control mice, similar to the reduction observed for SOM cells. This reduction in the number of NPY cells in PS1xAPP mice was not accompanied by significant reduction in the level NPY transcripts, although a slightly decline respect to WT animals was detected. This discrepancy might be possibly associated to an up-regulation of NPY mRNA expression by the remaining cell population, which displayed numerous dystrophic neurites around amyloid plaques.

In agreement with single immunolabelling studies, double SOM/NPY immunofluorescence labelling for confocal microscopy showed that the subpopulation of SOM cells that co-expresses NPY was highly affected in the PS1xAPP mice (Fig. 3.14 A compared to B). The presence of double-labelled dystrophic neurites indicated the existence of neurodegenerative changes in SOM/NPY interneurons in the double mutant mice.

6.5.5. Interneurons expressing Parvalbumin are highly resistant to neurodegeneration in the entorhinal cortex of PS1xAPP model

On the other hand, we did not find differences in the numerical density (neurons/mm³) of PV-positive cells in PS1xAPP mice (Fig. 3.18), as expected from the mRNA expression study (see Fig. 1A). Accordingly, at the tissue level, no differences in PV immunoreactivity were observed between PS1xAPP and WT or PS1 mice (Fig. 3.15-3.17). All together, these findings indicated that, in the entorhinal cortex of this AD model, the SOM/NPY-positive interneurons displayed an early vulnerability without affection of other interneuronal subpopulation such as PV-cells, as also observed in the hippocampal formation (Ramos et al., 2006).

6.5.6. Differential lamina-dependent vulnerability of Calretinin expressing neurons

Calretinin (CR)-positive interneurons represent, depending on the forebrain region, 10–30% of the total GABAergic cell population (Gonchar and Burkhalter, 1999). Several studies indicated that, as in the rodent hippocampus, cortical CR-positive interneurons preferentially target other interneurons (Freund and Buzsaki, 1996; Gonchar and Burkhalter, 1999). However, Wouterlood and colleagues (2000, 2008) have proposed that rat entorhinal cortex hosts two subpopulations of CR-immunopositive interneurons, neurons that express CR and GABA (inhibitory interneurons) and neurons that express CR and VGluT2, and not GABA, (excitatory interneurons). Similarly, Pothuizen et al. (2004) have shown two distinct calretinin-positive cell populations in monkey entorhinal cortex, one GABA-positive and another GABA-negative. The CR+/GABA+ cells are mainly located in superficial layers, whereas the CR+/GABA- cells are located preferentially in deep layers.

As in other cortical areas, in the entorhinal cortex, calretinin neurons have morphological characteristics of non-pyramidal cells. In our study, CR-positive cells were scattered throughout all cortical layers, being most abundant in superficial layers (where almost all CR neurons are GABA positive) (Figs. 3.19 and 3.20). CR-stained cells had bipolar

and multipolar dendritic tree configurations. All cortical layers contained positive fibres with the highest density in layer III. Layer I contained only a few calretinin neurons most of which are multipolar neurons with dendrites typically oriented parallel to the pial surface (Cajal-Retzius cells, shown to be also GABAergic non-pyramidal cells). Layers V-VI contained low density of bipolar and multipolar CR-positive neurons. Most of these deep CR neurons have been shown to be non-GABAergic. In 6 month-old PS1xAPP mice, we have detected by stereology a lamina selective decrease in CR neurons in deep layers ($17.27 \pm 7.07\%$; T-test, $P=0.01$) compared to control group mice of same age (Fig. 3.21 B). No changes in the density of CR-cells were detected in superficial layers.

6.5.7. The number of principal cells was selectively decreased in the infragranular layers of entorhinal cortex of PS1xAPP at 6 months of age

We next examined whether the principal cell number was also affected at early ages in this PS1xAPP model. To specifically distinguishing interneurons from principal cells, we have performed a multiple immunolabelling approach. The different molecular profiles of cortical interneurons can be defined by the combination of the interneuronal markers SOM, PV, CR and VIP (Miyoshi et al., 2007). Thus, to identify principal cells, we have first performed a multiple immunohistochemical labelling for bright field microscopy. We have combining anti-SOM, anti-PV, anti-CR and anti-VIP antibodies (cytoplasm of all cortical interneuronal populations should be labelled in dark blue colour by using DAB-nickel as chromogen) followed by anti-NeuN to label all neuronal cells (nuclei appeared in brown colour by using only DAB as chromogen). With this experimental approach, 5x multiple immunohistochemical labelling, principal cells should appear as single NeuN-labelled whereas all interneurons displayed double labelling. We choose this complex approach instead using classical GABA or GAD67 immunostaining to label all interneurons because we have observed that the number of somata immunopositive for these markers was always lower than for SOM or PV. This discrepancy could due to tissue antigen preservation, antibody penetration, intracellular location (cell body/axonal buttons), or simply that GABAergic neurons are not uniform with respect to level of GABA or GAD content to be detected by immunohistochemistry. The labelled neurons were then counted using unbiased stereological counting method in layers I-III (supragranular) and IV-VI (infragranular) 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 (Fig. 3.22 A-C), at 2 months of age, the 5x immunolabelled sections displayed no qualitative differences between WT and PS1xAPP animals. However, at 6 months, a marked decrease in the density of NeuN-labelled cells was clearly detected in the entorhinal cortex of PS1xAPP, as compared to WT and PS1 littermates (Fig. 3.23 A-C). This decrease was patent in the deep layers. 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. 3.22 D). However, in 6-month-old tg mice a significant entorhinal principal cell loss (compared non-tg littermates) was detected (Fig. 3.23 D). This cell loss ($27.26 \pm 8.24\%$; Student T-test, $p < 0.001$, $n=6$) was concentrated, as predicted, in the infragranular layers whereas no significant

Summary

differences were detected in supragranular layers. Though we have not analyzed layers V and VI separately, the degree of neuronal change in layer V seemed to be substantially larger 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 complete entorhinal cortex volume (10.50 ± 0.84 , 9.98 ± 0.93 or $9.93 \pm 1.52 \text{ mm}^3$, $n=6$, for WT, PS1 and PS1xAPP respectively) neither the layer I volume ($0.21 \pm 0.05 \text{ mm}^3$, $.21 \pm 0.02 \text{ mm}^3$, $0.19 \pm 0.05 \text{ mm}^3$, $n=6$, for WT, PS1 and PS1xAPP respectively).

6.5.8. The neurodegenerative process was paralleled by a reduction in VGAT mRNA in the entorhinal cortex of PS1xAPP at 6 months of age

Using mRNA samples, we have also quantified the expression of the GABAergic synaptic marker VGAT, the glutamatergic synaptic marker VGLUT1 as well as the general synaptic marker synaptophysin (Fig. 3.33). As shown, no differences were observed between PS1xAPP mice and age-matched control mice in any of the synaptic mRNAs quantified at 4 months of age, however the expression of VGAT mRNA in PS1xAPP mice displayed a significant reduction at 6 months of age ($34.23 \pm 21.33\%$, $n=4$; Tukey $p < 0.05$) compared to WT littermates. At this age, a decline in synaptophysin and VGLUT1 mRNAs was detected between WT and PS1xAPP mice though it was not statistically significant.

Though neuronal loss is a key neuropathological hallmark in AD brains, most of the tg model for this pathology failed to undergo neurodegeneration. We have previously demonstrated a selective and early (6 months) loss (50-60%) of SOM/NPY interneurons in the hippocampus of this PS1xAPP model (Ramos et al. 2006). Here, we extend our previous findings and demonstrate that this specific dendritic inhibitory subpopulation was also preferentially affected (56% and 46% for SOM and NPY, respectively) in all layers of the entorhinal cortex. However, perisomatic PV interneurons were highly preserved in this cortical region, as also seen in hippocampus (Ramos et al. 2006). These findings were strongly consistent with the prominent reduction of SOM and NPY neuropeptides in cortical post-mortem tissue from AD patients (Davies et al., 1980; Rossor et al., 1980; Arai et al., 1984; Beal et al. 1986c; Beal et al., 1986b; Reinikainen et al., 1987; Grouselle et al., 1998; Davis et al., 1999). It has been attributed to degeneration of intrinsic neurons (Morrison et al., 1985; Beal et al., 1986a; Nakamura and Vincent, 1986; Chan-Palay, 1987; Gaspar et al., 1989; Kumar, 2005).

On the other hand, while hippocampal pyramidal cells are not affected until advanced ages in this model (>17 months) (Schmitz et al., 2004; Jimenez et al., 2008), present results showed a patent entorhinal pyramidal cell loss (-27%) as early as 6 months of age. Therefore, pyramidal neurodegeneration occurs first in the entorhinal cortex than hippocampus in this double tg model. Neurodegeneration in entorhinal cortex is an early event in AD (Gomez-Isla et al., 1996; Kordower et al., 2001; Price et al., 2001), and takes place previous to hippocampal deterioration. Therefore, this PS1xAPP mouse mimics the initial stages of the pathology showing a temporal- and regional age dependent vulnerability,

with early entorhinal principal cell loss while hippocampus is affected later. Pyramidal loss in tg mice of middle ages has been described in the CA1/2 hippocampus (>50%) of 10 month-old APP^{PS1KI} mice (Casas et al., 2004). As well in the entorhinal cortex (19% reduction) of 9 month-old double mutant APP_{sw}xTau_{vlw} tg mice (Ribe et al., 2005), in the entorhinal cortex and subiculum of 9 month-old 5xFAD tg mouse (Oakley et al., 2006) and in the hippocampus and cortex of 13 months old regulatable APP/Tau model (Paulson et al., 2008). However, no quantitative analyse were done in the two later studies. Therefore, to the best of our knowledge, our PS1xAPP tg mouse displayed the earliest significant entorhinal neurodegeneration of principal cells (27% reduction at 6 months of age) so far reported in an AD model. The principal cell loss was found only in the entorhinal deep layers (IV-VI), whereas no significant changes were detected in superficial layers (II-III). Though we have not performed cell counting in each cortical lamina, by qualitative analysis layer V seemed to be more affected than layer VI. Reduced number of neurons has also been observed selectively in cortical layer V of the 5xFAD mouse model (Oakley et al., 2006).

OBJECTIVE #2

6.5.9. Neurodegeneration in the deep entorhinal cortex correlated with extracellular A β rather than intracellular A β accumulation

In this AD model, amyloid deposition occurs in hippocampus at very early ages (3-4 months, (Blanchard et al., 2003; Schmitz et al., 2004; Ramos et al., 2006; Caballero et al., 2007) which reflects the selective vulnerability of this brain region. Immunohistological detection of A β with 6E10 (Fig. 3.40) antibody in the entorhinal cortex of PS1xAPP mice revealed the presence of amyloid plaques also in young animals. In fact, A β plaques were clearly detectable since 4 months of age. Therefore, entorhinal cortex in this model was also a primary site of extracellular A β accumulation. In fact, substantially more amyloid plaques were seen in the entorhinal cortex and hippocampus than in other brain areas (not shown), following a similar temporal and spatial deposition pattern as reported in humans (Braak and Braak 1991; Thal et al. 2000; Thal et al. 2002). On the other hand, the number of plaques clearly increased with age. Amyloid deposits were immunopositive for anti-A β 1-40 (Fig. 3.41), anti-A β 1-42 (Fig. 3.42) and anti-M71/3 (Fig. 3.43) and positive for Thioflavin-S (Fig. 3.44) Congo red (Fig. 3.45) staining. No A β deposits were seen at 2 months of age with 6E10 antibody or Thioflavin-S staining. Interestingly, plaques were more abundant in deep layers of the entorhinal cortex at early ages and then spread with age to other layers. 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. 3.47, 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, t-test $p < 0.001$, $n=4$) than in superficial layers. Interestingly, the plaque formation in the deep layers was markedly

Summary

accelerated during this two months period (amyloid burden was 6.5 times greater at 6 months than at 4 months, t-test $p < 0.05$, $n = 4$).

The increase in the total amyloid load with age 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, and dissected into four surface categories ranging from $< 200 \mu\text{m}^2$ to $> 2000 \mu\text{m}^2$ (Fig. 3.48). As expected, there was a significant increase ($256.27 \pm 79.81\%$, $n = 5$, t-test $p < 0.05$) in the number of plaques/mm² at the age of 6 months (172.75 ± 53.80 at 6 months vs. 67.41 ± 21.32 at 4 months). The number of plaques falling into the range of 200, 200-500 y 500-2000 μm^2 increased (1.8, 2.3 and 11.3 times, respectively; $n = 5$, 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 APP and its metabolites using the mAb 6E10. Immunostaining with 6E10 and NU4 antibodies (Fig. 3.51-53) revealed a similar extracellular A β accumulation. On the other hand, intracellular 6E10 immunostaining was detectable since 2 months of age in numerous neurons located in layers II, III and VI of the entorhinal cortex (Fig. 3.54). Surprisingly, few scattered neurons in layer V displayed immunoreactivity for this antibody compared with neocortical areas at 2 and 6 months (Fig. 3.55).

Because of 6E10 immunolabeled A β peptides as well as APP full length and C99 fragments, these data could indicate that layer V neurons did not express the APP. Thus, the presence or absence of intracellular APP in this particular entorhinal layer was further investigated using an anti-hAPP C-terminal antibody. For these experiments, we used 2- and 4-month-old PS1xAPP tg mice, an age before the neuronal loss. In fact, double hAPP/6E10 immunofluorescent labeling revealed an overlapping of both markers within same neuronal somata (Fig. 3.56 and 3.57). However, the double-immunostained neurons were predominantly located in superficial layer 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. 3.63 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 Fig. 3.63 A and B, respectively). As in other cortical layers, neurons in layer V are devoid of intracellular A β ₄₂ immunostaining. However, other brain areas of same animals, such as subiculum (Fig. 3.64 A and C) and motor cortex layer V neurons (Fig. 3.64 B and D), displayed marked intracellular A β ⁴² immunoreactivity 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 also quantified the numerical density of layer V motor cortex neurons in 6 month-old WT and PS1xAPP mice and no significant changes were detected ($167.92 \pm 27.44 \times 10^3$ vs. $188.02 \pm 60.36 \times 10^3$ neurones/mm³ 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 APP 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.

The mechanism(s) that underlie this early entorhinal neuronal loss (SOM/NPY interneurons and principal cells) remains to be elucidated. However, the toxicity of A β has been suggested as main contributor for neurodegeneration in AD (reviewed in (LaFerla et al., 2007; Li et al., 2007). In this sense, a correlation between intraneuronal A β and neuronal death/dysfunction has been reported in several AD models (Oddo et al., 2003; Casas et al., 2004; Billings et al., 2005; Oakley et al., 2006; Bayer and Wirths, 2008). Furthermore, it has been recently reported (Christensen et al., 2008) that the neurons with early intraneuronal A β accumulation were preferentially lost (28%) in the frontal cortex of 6 month-old APPsPS1_{KI} mice. In our model, intracellular 6E10 immunostaining, restricted to principal cells, was found at very early ages (2 months), previous to the appearance of amyloid plaques (see also Masliah et al., 1996; Wirths et al., 2001; Oddo et al., 2003; Oakley et al., 2006). Entorhinal principal neurons from layers II and III displayed intense intracellular 6E10 immunoreactivity, however and surprisingly, these laminae showed no changes in their principal cell number. On the contrary, in layer V where principal cell loss was concentrated at 6 months of age, few scattered somata displayed intracellular immunoreactivity for this antibody, even in 2-month-old tg mice (well before the neuronal loss). Furthermore, few layer V neurons were also immunopositive for APP-C-terminal antibody at any age. Concerning to the intracellular A β immunoreactivity, the monoclonal 6E10 antibody is directed against A β 1-16 and thus could recognize APP products, including full-length APP. Therefore, we cannot exclude that the observed intracellular 6E10 immunostaining in superficial (II and III) and infragranular (VI) neurons, in fact, corresponded to the precursor protein rather than A β (see Fig. 3.56). Supporting this, we have not found intraneuronal immunoreactivity using A β 1-40 or A β 1-42 antibodies in any cortical layer. Similarly, no Thioflavin-S staining was seen within principal cell bodies throughout entorhinal laminae, indicating that these cells do not contain fibrillar A β , at least at these early ages. Thus, it seems unlikely that neuronal death in our model results from intracellular A β pathology, although the presence of prefibrillar oligomeric A β species within these neurons cannot be ruled out. Interestingly, deep principal cell death in the entorhinal cortex of this PS1xAPP tg model seemed to coincide quite well with extracellular instead intraneuronal accumulation of A β . Extracellular amyloid deposits, detected at 4 months of age and exhibiting a dramatic increase at 6 months, were mainly found in deep entorhinal layers. Our quantitative study of Thioflavin-S positive plaque load demonstrated that amyloid plaque formation was enhanced in layers V and VI (3.8% in deep layers vs. 0.9% in superficial layers at 6 months of age). Although we cannot exclude the existence of a selective vulnerability of infragranular principal neurons, our findings could also indicate that the preferential amyloid deposits in these layers might affect the survival of

Summary

the principal neurons. In this sense, it has been recently suggested that plaques are potentially major sources of soluble and toxic oligomeric A β (Martins et al. 2008).

This preferential amyloid deposition pattern in deep laminae is in agreement with the entorhinal connectivity and the release of A β by axonal projections as a principal contributor to amyloid deposition. In fact, lesions of cortical axon fibres that project to the dentate gyrus substantially reduce A β accumulation in this hippocampal region in APP tg mice (Lazarov et al. 2002; Sheng et al. 2002). Moreover, synaptic activity and, specifically, synaptic vesicle exocytosis, is linked with neuronal A β release (Cirrito et al. 2005; Cirrito et al. 2008). In the entorhinal cortex, the projections to the deep layers arise largely from CA1 and subiculum (for review see Canto et al. 2008). The principal cells of these two hippocampal regions displayed intense intracellular 6E10 and APP staining since 2 months of age (Ramos et al. 2006), and our unpublished data), explaining the massive plaque development in deep entorhinal layers at early ages (75% of the entorhinal plaque loading at 6 months). Accordingly, the superficial layers receive innervations from areas such as entorhinal deep layers, amygdale, parasubiculum or presubiculum (for review see Canto et al. 2008), regions with low level of intraneuronal 6E10 at early ages in this model (present study and our unpublished results). This data explains the limited extracellular accumulation of A β in the superficial layers of entorhinal cortex (25% of the entorhinal amyloid burden at 6 months). On the other hand, the intense 6E10 immunolabelling of entorhinal layers II and III neurons correlates well with significant early plaque formation in the perforant path in terminal fields. Specifically, dentate gyrus and CA3 receive projections from layer II whereas CA1 and subiculum from layer III (Van Groen, 2001). In the same way, the scarce number of neurons with intracellular 6E10 staining detected in layer V also correlated with the absence or scarce presence of amyloid deposits in some of its axonal terminal fields such as amygdale and striatum (our unpublished results). Therefore, in our model, the loss of deep principal cells seems to correlate with the preferential local accumulation of extracellular A β synaptically released by afferent axon terminals. In agreement with the idea, interneurons do not over-express the mutated human APP (Ramos et al., 2006), indicating that the selective loss of SOM/NPY cells was not either associated with intracellular amyloid formation. However, SOM/NPY cell lost was distributed evenly in entorhinal superficial and deep layer, indicating that other factors, rather than accumulation of A β deposits which were mainly concentrated in deep layers, were involved in neuronal death of this population.

OBJECTIVE #3**6.5.10. Early entorhinal neurodegeneration in superficial and deep layers coincides with widespread cytotoxic glial inflammatory response**

The A β deposits were associated with progressive activation of inflammatory pathways in the brain. In fact, inflammatory processes have been reported as direct contributors to disease pathogenesis (Griffin et al., 1998; Wyss-Coray, 2006; Craft et al., 2006; Heneka and O'Banion, 2007; Rojo et al., 2008). Furthermore, we have recently

described the existence of an early A β associated neuroinflammation in the hippocampus of our PS1xAPP model (Jimenez et al., 2008).

As shown in Fig. 3.65, in the entorhinal cortex of these PS1xAPP mice and in parallel to the A β deposition, there was an early inflammatory response, as assessed by the expression of microglial (CD11b) and astroglial (GFAP) markers by RT-PCR and immunohistochemistry. Quantitative real-time RT-PCR in microdissected entorhinal cortex from 4 and 6 months of age, revealed a significant up-regulation of CD11b (3.46 ± 0.62 , $n=4$; Tukey, $p<0.001$) and GFAP (12.24 ± 0.86 , $n=4$; Tukey, $p<0.001$) mRNAs in 6 month-old PS1xAPP animals respect to age-matched wild-type animals. The increase in GFAP mRNA in PS1xAPP tg mice was also significant at 4 months of age (2.22 ± 0.67 , Tukey, $p<0.05$, $n=4$). 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 correlates with the initial appearance of A β plaques in double mutant mice. This early inflammatory response in PS1xAPP mice could be implicated in the neuronal loss observed in the entorhinal infragranular laminae. We then addressed the inflammatory response at the cellular level by immunohistochemistry. For this purpose, coronal sections of entorhinal cortex of PS1xAPP mice were immunostained with anti-CD11b (Fig. 3.66) and anti-Iba1 (Fig. 3.68) antibodies to identify activated microglial cells. Microscopic analysis demonstrated the presence of activated microglial cells surrounding A β plaques at 4- and 6-months of age. Because plaques concentrated in deep layers, most activated microglial cells were obviously found in these layers. Morphologically, these activated glial cells displayed enlargement of the cell body and retraction and swelling of microglial processes (Fig. 3.67) compared to the resting microglial (small cell body and thin and highly ramified processes) seen in control mice. This close association of activated microglia and plaques in double tg mice was confirmed by double fluorescent TS/CD11b and 6E10-Tomato lectin staining and confocal microscopy (Fig. 3.69).

However, GFAP immunostaining that was also highly increased in PS1xAPP entorhinal cortex since early ages (Fig. 3.70 and 3.71) compared to age-matched non-transgenic mice, did not displayed a clear association with A β plaques, instead PS1xAPP reactive astrocytes were located along the cortical column. Numerous reactive astrocytes with cell body hypertrophy and thickened processes were seen in the double mutant mice (see inset in Fig. 3.71 C). Though no apparent close association of GFAP-positive cells with plaques was detected in single GFAP-labelled sections, double immunolabelling GFAP-6E10 experiments determined the existence of reactive astrocytes surrounding A β plaques and even some processes infiltrating these deposits (Fig. 3.72).

Therefore, we analyzed the expression of several classic cytotoxic factors by RT-PCR in microdissected entorhinal cortex at 4 and 6 months of age (Fig. 3.74). As expected, mRNA levels of TNFalpha (2.60 ± 0.97 , $n=4$; Tukey $p<0.05$) and TRAIL (2.48 ± 0.66 , $n=4$; Tukey, $p<0.05$) were significant up-regulated in PS1xAPP mice since 4 months of age. The expression of TNFalpha further increased at 6 months of age (4.77 ± 2.62 , $n=4$; Tukey, $p<0.05$) 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 mRNA was detected

Summary

as 6 months of age (3.99 ± 1.37 , $n=4$; Tukey, $p < 0.001$), 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 (Fig. 3.75 A). An up-regulation of DR5, COX2 and NOX1 (Fig. 3.76 B) mRNAs was detected though it was not statistically significant.

The cellular origin of potential cytotoxic factors iNOS and TNF α was determined using specific immunolabelling in tissue sections. Results demonstrated an intense immunostaining for TNF α in PS1xAPP animals at 6 months of age (Fig. 3.75 A-D), compared to age-matched control mice that showed no immunoreactivity for those antigen. The immunostaining was concentrated in cells with microglial morphology evenly distributed throughout cortical layers I-VI. Figure 3.75 D shows a clear microglial cell immunopositive for TNF α . Interestingly, the periphery of amyloid plaques, where the microglial cells were concentrated, was immunonegative for this marker (Fig. 3.75 C). On the other hand, and parallel to the increased expression of TNF α , the immunostaining for TNF receptor1 (TNFR1) in PS1xAPP entorhinal cortex (Fig. 3.75 E-H) was more intense than in control group. This TNFR1 staining was detected throughout all cortical layers and concentrated in the neuropile surrounding neuronal cell bodies.

On the other hand, an iNOS immunostaining was present in glial cells with astrocytic morphology since 4 months of age in the entorhinal cortex of the double PS1xAPP mutant mice (Fig. 3.77). These iNOS-positive cells were mainly located in the deep cortical layers at 4 and 6 months of age whereas, at 12 and 18 months, were also observed in superficial layers. Double GFAP-iNOS labelling and confocal microscopy demonstrated the astrocytic origin of all iNOS-positive cells (Fig. 3.78). At 2 months of age, no iNOS-positive cells were detected in PS1xAPP. Control mice showed none or very few iNOS positive cells at these early ages.

The microglial cells closely associated to plaques expressed Ym1 (Fig. 3.79), a marker of the non-pro-inflammatory alternative phenotype (Edwards and Robinson, 2006). On the other hand, microglial cells located in the inter-plaque regions and displaying an intermediate morphology between quiescent and activated were also observed. These cells were Ym1 negative and probably could adopt a different functional phenotype. Thus, microglial cells, closely associated to deposits, displayed a non cytotoxic Ym1 positive phenotype (Fig. 3.79), whereas the inter-plaque microglia adopted a pro-inflammatory cytotoxic TNF α positive (and Ym1 negative) phenotype, as we have previously reported for the hippocampus of aged mice (Jimenez et al., 2008).

A β plaques also induced a neuroinflammatory process that might substantially contribute to neurodegeneration by releasing cytotoxic agents such as inflammatory cytokines, excitatory amino acids, reactive oxygen intermediates and other factors (Itagaki et al., 1989; Chao et al., 1996; Hu et al., 1998; Johnstone et al., 1999; Apelt and Schliebs, 2001; Mrak and Griffin, 2005; Craft et al., 2006; Ralay Ranaivo et al., 2006; Zipp and Aktas, 2006). We have recently reported the existence of an early A β -associated inflammatory process that progressively increased with age, in the hippocampus of our PS1xAPP model (Jimenez et al., 2008). In the entorhinal cortex, also coincident with the amyloid plaque

deposition, there was a marked increase in the activated microglia and reactive astrocyte populations. At these early ages (4-6 months), activated microglial cells were clustered surrounding and infiltrating A β plaques as occurs in AD brains (Heneka and O'Banion, 2007) and accordingly with a recent *in vivo* demonstration of amyloid plaques activating and recruiting microglia (Meyer-Luehmann et al., 2008). These activated microglial cells could exert a beneficial function, restricting plaque formation by phagocytosis or promote disease by causing neuronal damage (El Khoury and Luster, 2008; Farfara et al., 2008; Ramos et al., 2006; Jimenez et al., 2008). Moreover, microglia could display different phenotypes during the progression of the disease pathogenesis. In fact, we have recently reported a functional switch of microglial cells in the hippocampus of this model (Jimenez et al., 2008). At early ages (6 months), hippocampal activated microglial cells were closely associated to amyloid deposits and displayed an alternative phenotype with neuroprotective features. On the other hand, at 18 months, hippocampal interplaque regions also showed activated microglia displaying a classic cytotoxic phenotype (expressing TNF-alpha and related factors) which correlated in time manner with marked hippocampal cell loss. Interestingly, in the entorhinal cortex we have observed a widespread cytotoxic inflammatory environment, with significant up-regulation of TNFalpha (expressed by microglial cells), TRAIL as well as iNOS (expressed by astroglial cells). Thus, we propose that this ubiquitous inflammatory reaction might be implicated in the degeneration of SOM/NPY cells in both superficial and deep layers.

Interestingly, 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, (see Fig. 4.3 and Jimenez et al., 2008). Therefore, it is relevant to consider that, at the same age, the A β associated inflammatory response could play different roles in entorhinal cortex (classic pro-inflammatory phenotype, probably involved in neurodegeneration) and hippocampus (alternative phenotype; probably neuroprotective). Importantly, the existence of these opposite inflammatory reactions in the most vulnerable brain regions to AD at the same age might be involved in the controversial/disappointing results of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDS) trials for protecting against the development of AD (McGeer and McGeer, 2007; Aisen, 2008).

OBJECTIVE #4

6.5.11. Chronic lithium treatment prevents neurodegeneration in the entorhinal cortex of PS1xAPP mice

Lithium is a compound used as a mood stabilizer, which is neuroprotective in a variety of disease models, such as brain ischemia (Cappuccio et al., 2005) and kainate toxicity (Busceti et al., 2007), and in human amyotrophic lateral sclerosis (Fornai et al., 2008). The ability of lithium to promote autophagy, through the inhibition of the inositol-monophosphatase 1 (Berridge and Irvine, 1989; Berridge et al., 1989; Sarkar et al., 2005), together with the protective effects of autophagy in neurodegeneration (Cuervo et al., 2004;

Summary

Rubinsztein et al., 2005; Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006), prompted us to test the neuroprotective effects of lithium in our PS1xAPP mouse model.

As described above SOM and NPY interneurons in the entorhinal cortex of 6 month-old PS1xAPP mice were severely decreased (56% and 46% loss respectively). Remarkably, dietary lithium administration to PS1xAPP mice (from 3 to 9 months of age) led to prominent reduction of dystrophic neurites containing SOM and/or NPY and the preservation of the number of these neurons similar to non-tg WT or tg PS1 mice. Stereological studies confirmed these findings, in fact SOM-cells in PS1xAPP treated mice increased 37% (student t-test, $p < 0.05$, $n = 3$) when compared with PS1xAPP control mice of same age (this group showed 52% decrease). Then, the number of SOM interneurons in Lithium PS1xAPP mice was quite similar when compared to PS1 control groups (85%) indicating that lithium had an important neuroprotective effect on this population. Regarding NPY-cells, even better results were obtained. Lithium treated PS1xAPP mice showed an increase of 49% (student t-test, $p < 0.05$, $n = 3$) in the numerical density when compared to PS1xAPP control group (this showed a 43% decrease). Therefore, In this case, the number of NPY-positive cells in PS1xAPP mice treated with lithium was comparable, or slight higher, to that found in the PS1 control groups (106.05%). We have not determined by stereology the number of principal cells in lithium treated PS1xAPP mice due to methodological considerations, however, qualitative assessment of NeuN immunostaining, the number of deep entorhinal neurons seemed not to be affected in these animals compared to PS1xAPP control group. This suggests a possible preservation of these neurons by lithium similar to that observed for the interneurons.

Because reports suggest that lithium may reduce the A β burden in mice (Phiel et al., 2003; Su et al., 2004), we then investigated whether it reduced the A β plaque formation in the PS1xAPP mice by immunohistochemical studies (6E10 and NU4 antibodies) and Congo red staining. No apparent changes in the density of amyloid plaques were detected between PS1xAPP mice treated with lithium and those untreated. However, a slight difference in the type of plaques was observed. In this sense, animals treated with lithium showed more diffuse plaques than control group. Therefore, lithium treatment seemed not to affect A β load in this AD model though diffuse plaques were more abundant than compact plaques. Interestingly, there was a marked reduction of inter-plaque activated microglia as seen with Iba1 antibody, as well as around plaques. This was accompanied by a reduction of iNOS-positive astroglial cell density. Taken all together, these findings indicate a reduced toxic inflammatory reaction in lithium treated animals.

Our results demonstrated robust neuroprotective effect of chronic oral lithium treatment, against early neurodegeneration in our PS1xAPP model. In addition, there was a reduced cytotoxic inflammatory response without apparent changes in A β plaque loading. Lithium has been reported to have a neuroprotective effect against A β -induced neuronal death (Alvarez et al., 1999; Wada et al., 2005; Zhong and Lee, 2007) and chronic treatment with lithium reduces tau lesions and neurodegeneration in transgenic models of tauopathies. Since lithium directly inhibits glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) (Klein and Melton,

1996), the modulation of the activity of this protein kinase has been proposed as a molecular mechanism for the neuroprotection provided by lithium (Li et al., 2002). The mechanisms through which lithium regulates GSK3 β activity are not completely clear. Recent studies support the possibility that lithium regulates the PI3K–Akt pathway (Klein and Melton, 1996; Chalecka-Franaszek and Chuang, 1999; Mora et al., 1999; Takahashi et al., 1999; Bhat et al., 2000; Elyaman et al., 2002; Mai et al., 2002), which is directly upstream of GSK3 β (Cross et al., 1995).

Because in AD, overactive GSK3 β favours the amyloidogenic cleavage of APP, in this study, we have also determined whether lithium could prevented or lower A β plaques in PS1xAPP mice and found that, at least with the experimental paradigm used here, oral lithium administration did not change A β load at these early ages. However, it is possible that a longer lithium treatment will reduce plaque load. The effects of lithium on A β production are controversial in vitro (Phiel et al., 2003; Feyt et al., 2005; Caccamo et al., 2007) and in vivo. In particular, it has been shown that lithium reduces A β levels in APP/PS1 double-tg mice (Phiel et al., 2003). In addition, the administration of lithium to pre-pathological mice for 6 months prevented A β deposition in single APP tg mice (Su et al., 2004). However, lithium treatment did not reduced A β plaques in 3xTg-AD model (Caccamo et al., 2007), similar as we have found in our PS1xAPP model.

The neuroprotective effects of lithium in the hAPP tg mice might not be exclusively related to the effects of this compound on the GSK3 β signalling cascade but might involve the regulation of other kinases involved in neurodegeneration such as CDK5 and SAPK (Iijima et al., 2000; Ryder et al., 2003). Moreover, lithium has been shown to regulate the expression of oncogenes such as Bcl-2, p53, and Bax (Bcl-2-associated X protein) (Chen and Chuang, 1999) and to inhibit protein phosphatase A2 (Mora et al., 2002). Lithium is able to regulate the c-Jun NH2-terminal kinase pathway (Yuan et al., 1999) and to regulate the expression and function of transcription factors that bind to the activator protein-1 and cAMP response element sites, which play an important role in regulating cell survival (Ozaki and Chuang, 1997; Yuan et al., 1999). Furthermore, at therapeutically relevant doses, lithium regulates inositol metabolism (O'Donnell et al., 2000; Williams et al., 2002) and activates the phosphoinositol-3 kinase (PI3K)–Akt signalling pathway (Chalecka-Franaszek and Chuang, 1999; Mora et al., 1999) that is known to inhibit GSK3 β , thereby promoting cell survival (Cross et al., 1995; Shaw and Cohen, 1999; Hashimoto et al., 2002). At the same time, lithium is shown to be an autophagy inducer, leading to up-regulation of the autophagy-lysosomal degradative pathway (Sakar and Rubinstein, 2006; Sakar et al., 2007). A recent study has shown that lithium administration slows the progression of the devastating neurodegenerative disease of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) by inducing autophagy (Fornai et al., 2008). In our study, lithium treatment resulted in a prominent reduction of dystrophic neurites containing SOM or NPY neuropeptides, and it is tempting to speculate that the neuroprotective effect of lithium in our model was through the induction of autophagy increasing protein/organelle turnover in the injured and regenerating neurites, leading to reduced levels of intracellular toxic forms of A β .

Summary

At the ultrastructural level, swollen (dystrophic) neurites in the AD brain are abundantly filled with collections of vacuolar structures, including acid-phosphatase-positive lysosome-dense bodies enriched in cathepsins (Suzuki and Terry, 1967). Moreover, proliferation of lysosomes in the cell bodies of affected neurons, another obvious feature of the cellular pathology in AD reflects a strongly up-regulated synthesis of components of the lysosomal system (Cataldo et al., 1990; Cataldo et al., 1991; Cataldo et al., 1995). Recent clues come from detailed ultrastructural analyses showing that the vesicles that accumulate in dystrophic neurites are not actually lysosomes but are mainly autophagic vacuoles (AVs) (Nixon et al., 2005). Yu et al. (2005) have also shown that AVs accumulate in the brains of AD patients and presenilin-1 (PS1)/APP mice, which is an AD model in which both human mutant PS1 and mutant APP are expressed. These AVs represent intermediate stages in macroautophagy, the lysosomal pathway responsible for degrading cytoplasmic constituents, including organelles. Among the implications of this pathology (Nixon, 2006) is its possible major contribution to the hallmark amyloid lesions of AD, a possibility supported by observations that AVs generate A β and fuse with endosomes – another A β -generating compartment. In support of impaired autophagy in AD, Pickford et al. (2008) have recently reported that beclin 1, an essential protein of the autophagy pathway, was strongly reduced in the brains of AD patients. Preliminary data from Dr. Vitorica's group indicate an accumulation of autophagy vesicles (increased levels of LC3 and Beclin1 mRNAs) in our PS1xAPP model at advanced ages (non published results). Beclin1 deficiency in APP tg mice reduced neuronal autophagy, disrupted lysosomes, promoted intracellular and extracellular A β accumulation, and resulted in neurodegeneration. Locally increasing beclin 1 expression reduced amyloid pathology in APP tg mice. They also found that beclin 1 was significantly reduced in early stages of AD in affected brain regions. Because over-expression of beclin 1 can reduce A β pathology in mice, therefore, restoring autophagy may be a potential approach to treat AD in early stages.

In sum, neurodegeneration of principal neurons in the entorhinal cortex of PS1xAPP model occurs earlier than in hippocampus, as also observed in AD brains. Furthermore, there is a profound early loss of SOM/NPY interneurons resembling also the neuropathology in humans. The ubiquitous loss of SOM cells seems to be correlated with the cytotoxic inflammatory reaction whereas the deep principal cells could be also affected by the preferential accumulation of extracellular A β . 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 β species. Finally, this model recapitulates some of the neuropathological changes of the human pathology and may represent a valuable tool to validate the efficacy of novel drugs directed to modulate glial activity by reducing their neurotoxic properties and enhance their neuroprotective effects at the initial

phases of this pathology. Our study further supports the therapeutic rationale of using lithium as neuroprotective agent in the treatment of AD.

In consequence, the present work provides evidence of the heterogeneous nature of Alzheimer's disease pathology at the regional and, even, at the cellular level. This complexity should be taking into consideration for the development of new therapeutically strategies and multiple treatments should be expected.

7. Bibliografía

- Acarin L, Vela JM, Gonzalez B, Castellano B.** Demonstration of poly-N-acetyl lactosamine residues in ameboid and ramified microglial cells in rat brain by tomato lectin binding. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 42(8):1033-41 (1994).
- Aisen PS.** Anti-inflammatory therapy for Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 21(3):447-8 (2000).
- Aisen PS, Schafer KA, Grundman M, Pfeiffer E, Sano M, Davis KL, Farlow MR, Jin S, Thomas RG, Thal LJ.** Effects of rofecoxib or naproxen vs placebo on Alzheimer disease progression: a randomized controlled trial. *The Journal of the American Medical Association*. 289(21):2819-26 (2003).
- Aisen PS.** The inflammatory hypothesis of Alzheimer disease: dead or alive? *Alzheimer Disease and Associated Disorders*. 22(1):4-5 (2008).
- Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T.** Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 21(3):383-421 (2000).
- Allen B, Ingram E, Takao M, Smith MJ, Jakes R, Virdee K, Yoshida H, Holzer M, Craxton M, Emson PC, Atzori C, Migheli A, Crowther RA, Ghetti B, Spillantini MG, Goedert M.** Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. *The Journal of Neuroscience*. 22(21):9340-51 (2002).
- Alonso A, Klink R.** Differential electroresponsiveness of stellate and pyramidal-like cells of medial entorhinal cortex layer II. *Journal of Neurophysiology*. 70(1):128-43 (1993).
- Alvarez G, Muñoz-Montano JR, Satrustegui J, Avila J, Bogonez E, Diaz-Nido J.** Lithium protects cultured neurons against beta-amyloid-induced neurodegeneration. *FEBS Letters*. 453(3):260-4 (1999).
- Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR.** An English translation of Alzheimer's paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clinic Anatomy*. 8(6):429-31 (1995).
- Amaral DG, Witter MP.** The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*. 31(3):571-91 (1989).
- Ampuero I, Ros R, Royuela A, Abaira V, del Ser T, Garcia-Ribas G, Garcia de Yebenes J.** 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. *Journal of Alzheimer Disease*. 14(2):179-91 (2006).
- Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J.** The hippocampus book. *Oxford University Press*. (2008).
- Andorfer C, Kress Y, Espinoza M, de Silva R, Tucker KL, Barde YA, Duff K, Davies P.** Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *Journal of Neurochemistry*. 86(3):582-90 (2003).
- Apelt J, Schliebs R.** 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 Research*. 894(1):21-30 (2001).
- Arai H, Moroji T, Kosaka K.** Somatostatin and vasoactive intestinal polypeptide in postmortem brains from patients with Alzheimer-type dementia. *Neuroscience Letters*. 52(1-2):73-8 (1984).
- Aravalli RN, Peterson PK, Lokensgard JR.** Toll-like receptors in defense and damage of the central nervous system. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2(4):297-312 (2007).
- Armstrong RA.** Plaques and tangles and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Folia Neuropathologica*. 44(1): 1-11 (2006).
- Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW.** The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cerebral Cortex*. 1(1):103-16 (1991).
- Atwood CS, Martins RN, Smith MA, Perry G.** Senile plaque composition and posttranslational modification of amyloid-peptide and associated proteins. *Peptides*. 23:1343-1350 (2002).
- Baglietto-Vargas D.** Caracterización neuropatológica del hipocampo del modelo transgénico murino PS1(M146L)xAPP(751SL) de la enfermedad de Alzheimer. *Tesis Doctoral*. (2008).
- Bak TH, Mioshi E.** A cognitive bedside assessment beyond the MMSE: the Addenbrooke's cognitive examination. *Practical Neurology*. 7(4):245-9 (2007).

Bibliografía

- Baraban SC, Tallent MK.** Interneuron Diversity series: Interneuronal neuropeptides--endogenous regulators of neuronal excitability. *Trends in Neurosciences*. 27(3):135-42 (2004).
- Bartus RT, Dean RL 3rd, Beer B, Lippa AS.** The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*. 217(4558):408-14 (1982).
- Basselin M, Villacreses NE, Lee HJ, Bell JM, Rapoport SI.** Chronic lithium administration attenuates up-regulated brain arachidonic acid metabolism in a rat model of neuroinflammation. *Journal of Neurochemistry*. 102(3):761-72 (2007).
- Bayer TA, Wirths O.** Review on the APP/PS1KI mouse model: intraneuronal Abeta accumulation triggers axonopathy, neuron loss and working memory impairment. *Genes, brain, and behaviour*. 7 Suppl 1:6-11 (2008).
- Beal MF, Mazurek MF, Svendsen CN, Bird ED, Martin JB.** Widespread reduction of somatostatin-like immunoreactivity in the cerebral cortex in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*. 20(4):489-95 (1986a).
- Beal MF, Mazurek MF, Martin JB.** Somatostatin is reduced in Parkinson's disease dementia with Alzheimer's changes. *Brain Research*. 397(2):386-8 (1986b).
- Beal MF, Mazurek MF, Chattha GK, Svendsen CN, Bird ED, Martin JB.** Neuropeptide Y immunoreactivity is reduced in cerebral cortex in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*. 20(3):282-8 (1986c).
- Bennett DA, Whitmer RA.** NSAID exposure and risk of Alzheimer disease. Is timing everything? *Neurology*. Epub ahead of print (2009).
- Benzing WC, Brady DR, Mufson EJ, Armstrong DM.** Evidence that transmitter-containing dystrophic neurites precede those containing paired helical filaments within senile plaques in the entorhinal cortex of nondemented elderly and Alzheimer's disease patients. *Brain Research*. 619(1-2):55-68 (1993).
- Berridge MJ, Irvine RF.** Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*. 341(6239):197-205 (1989).
- Berridge MJ.** Neural and developmental actions of lithium: a unifying hypothesis. *Cell*. 59(3):411-9 (1989).
- Bhat RV, Shanly J, Correll MP, Fieles WE, Keith RA, Scott CW, Lee CM.** Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in cellular and animal models of neuronal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 97(20):11074-9 (2000).
- Biessels GJ, Kappelle LJ.** Increased risk of Alzheimer's disease in type II diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology? *Biochemical Society Transactions*. 33:1041-4 (2005).
- Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM.** Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron*. 45(5):675-88 (2005).
- Bitting L, Naidu A, Cordell B, Murphy GM Jr.** Beta-amyloid peptide secretion by a microglial cell line is induced by beta-amyloid-(25-35) and lipopolysaccharide. *The Journal of Biological Chemistry*. 271(27):16084-9 (1996).
- 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.** Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with Abeta deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Experimental Neurology*. 184(1):247-63 (2003).
- Bobinsky M, de Leon MJ, Convit A, De Santi S, Wegiel J, Tarshish CY, Saint Louis LA, Winsniewski HM.** MRI of entorhinal cortex in mild Alzheimer's disease. *Lancet*. 353(9146):38-40 (1999).
- Bodendorf U, Danner S, Fischer F, Stefani M, Stuchler-Pierrat C, Wiederhold KH, Staufenbiel M, Paganetti P.** Expression of human beta-secretase in the mouse brain increases the steady-state level of beta-amyloid. *Journal of Neurochemistry*. 80(5):799-806 (2002).
- Boland B, Kumar A, Lee S, Platt FM, Wegiel J, Yu WH, Nixon RA.** Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience*. 28(27):6926-37 (2008).
- Bolmont T, Haaiss F, Eicke D, Radde R, Mathis C, Klunk WE, Kohsaka S, Jucker M, Calhoun ME.** Dynamics of the microglial/amyloid interaction indicate a role in plaque maintenance. *Journal of Neuroscience*. 28(16):4283-92 (2008).
- Bondolfi L, Calhoun M, Ermini F, Kuhn HG, Wiederhold KH, Walker L, Staufenbiel M, Jucker M.** Amyloid-associated neuron loss and gliogenesis in the neocortex of amyloid precursor protein transgenic mice. *The Journal of Neuroscience*. 22(2):515-22 (2002).
- Borchet DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada CM, Kim G, Seekins S, Yager D, Slunt HH, Wang R, Seeger M, Levev AI, Gandy SE, Copeland NG, Jenkins NA, Price DL, Younkin SG, Sisodia SS.** Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron*. 17(5):1005-13 (1996).

- Borchet DR, Ratovitski T, van Lare J, Lee MK, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Price DL, Sisodia SS.** Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron*. 19(4):939-45 (1997).
- Borenstein AR, Copenhagen CI, Mortimer JA.** Early-life risk factors for Alzheimer disease. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*. 20(1):63-72 (2006).
- Bouras C, Hof PR, Giannakopoulos P, Michel JP, Morrison JH.** Regional distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques in the cerebral cortex of elderly patients: a quantitative evaluation of a one-year autopsy population from a geriatric hospital. *Cerebral Cortex*. 4(2):138-50 (1994).
- Boutajangout A, Authelet M, Blanchard V, Touchet N, Tremp G, Pradier L, Brion JP.** Characterisation of cytoskeletal abnormalities in mice transgenic for wild-type human tau and familial Alzheimer's disease mutants of APP and presenilin-1. *Neurobiology of Disease*. 15(19):47-60 (2004).
- Braak H, Braak E.** On areas of transition between entorhinal allocortex and temporal isocortex in the human brain. Normal morphology and lamina-specific pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*. 68(4):325-32 (1985).
- Braak E, Braak H.** Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*. 82(4):239-59 (1991).
- Braak H, Braak E.** The human entorhinal cortex: normal morphology and lamina-specific pathology in various diseases. *Neuroscience Research*. 15(1-2):6-31 (1992).
- Bradley JR.** TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of Pathology*. 214(2):149-60 (2008).
- Brandt R, Hundelt M, Shahani N.** Tau alteration and neuronal degeneration in taupathies: mechanisms and model. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1739(2-3):331-54 (2005).
- Breitner JC, Haneuse SJ, Walker R, Dublin S, Crane PK, Gray SL, Larson EB.** Risk of dementia and AD with prior exposure to NSAIDs in an elderly community-based cohort. *Neurology*. Epub ahead of print (2009).
- Brion JP, Resibois A.** A subset of calretinin-positive neurons are abnormal in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*. 88(1):33-43 (1994).
- Brun A, Englund E.** Regional pattern of degeneration in Alzheimer's disease: neuronal loss and histopathological grading. *Histopathology*. 5(5):549-64 (1981).
- Burgess SK, Jacobs S, Cuatrecasas P, Sahyoun N.** Characterization of a neuronal subtype of insulin-like growth factor I receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. 262(4):1618-22 (1987).
- Burgos-Ramos E, Hervas-Aguilar A, Aguado-Llera D, Puebla-Jimenez L, Hernandez-Pinto AM, Barrios V, Arilla-Ferreiro E.** Somatostatin and Alzheimer's disease. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 286(1-2):104-111 (2008).
- Burwell RD, Amaral DG.** Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: interconnectivity and connections with the entorhinal cortex. *The Journal of Comparative Neurology*. 391(3):293-321 (1998a).
- Burwell RD, Amaral DG.** Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*. 398(2):179-205 (1998b).
- Busceti CL, Biagioni F, Aronica E, Rizzo B, Storto M, Battaglia G, Giorgi FS, Gradini R, Fornai F, Caricasole A, Nicoletti F, Bruno V.** Induction of the Wnt inhibitor, Dickkopf-1, is associated with neurodegeneration related to temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 48(4):694-705 (2007).
- Buscilio J, Yeh J, Yanker BA.** beta-Amyloid neurotoxicity in human cortical culture is not mediated by excitotoxins. *Journal of Neurochemistry*. 61(4):1565-8 (1993).
- Butovsky O, Talpalar AE, Ben-Yaakov K, Schwartz M.** Activation of microglia by aggregated beta-amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN-gamma and IL-4 render them protective. *Molecular and Cellular Neurosciences*. 29(3):381-93 (2005).
- Butovsky O, Koronyo-Hamaoui M, Kunis G, Ophir E, Landa G, Cohen H, Schwartz M.** Glatiramer acetate fights against Alzheimer's disease by inducing dendritic-like microglia expressing insulin-like growth factor 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 103(31):11784-9 (2006).
- Butovsky O, Kunis G, Koronyo-Hamaoui M, Schwartz M.** Selective ablation of bone marrow-derived dendritic cells increases amyloid plaques in a mouse Alzheimer's disease model. *The European Journal of Neuroscience*. 26(2):413-6 (2007).
- Caballero C, Jimenez S, Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Gavilan MP, Eamos B, Del Rio JC, Vizuete M, Gutierrez A, Ruano D, Vitorica J.** Inter-individual variability in the expression of the mutated form of hPS1M146L determined the production of Aβ peptides in the PS1xAPP transgenic mice. *Journal of Neuroscience Research*. 85(4):787-97 (2007).

Bibliografía

- Caballero-Bleda M, Witter MP.** Regional and laminar organization of projections from the presubiculum and parasubiculum to the entorhinal cortex: an anterograde tracing study in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*. 328(1):115-29 (1993).
- Cabrejo L, Guyant-Mrechal L, Laquerriere A, Vercelletto M, De la Fourniere F, Thomas-Anterion C, Verny C, Letournel F, Pasquier F, Vital A, Checler F, Frebourg T, Campion D, Hannequin D.** Phenotype associated with APP duplication in five families. *Brain*. 129(Pt 11):2966-76 (2006).
- Caccamo A, Oddo S, Tran LK, LaFerla FM.** Lithium reduces tau phosphorylation but not A beta or working memory deficits in a transgenic model with both plaques and tangles. *The American Journal of Pathology*. 170(5):1669-75 (2007).
- Cagnin A, Brooks DJ, Kennedy AM, Gunn RN, Myers R, Turkheimer FE, Jones T, Banati RB.** In-vivo measurement of activated microglia in dementia. *Lancet*. 358(9280):461-7 (2001).
- Cai H, Wang Y, McCarthy D, Wen H, Borchelt DR, Price DL, Wong PC.** BACE1 is the major β -secretase for generation of A β peptides by neurons. *Nature Neuroscience*. 4(3):233-4 (2001).
- Canto CB, Wouterlood FG, Witter MP.** What does the anatomical organization of the entorhinal cortex tell us?. *Neuronal Plasticity*. 2008:381243 (2008).
- Cappuccio I, Calderone A, Busceti CL, Biagioni F, Pontarelli F, Bruno V, Storto M, Terstappen GT, Gaviraghu G, Fornai F, Battaglia G, Melchiorri D, Zukin RS, Nicoletti F, Caricasole A.** Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is required for the development of ischemic neuronal death. *The Journal of Neuroscience*. 25(10):2647-57 (2005).
- Cardona AE, Piro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, Huang D, Kidd G, Dombrowski S, Dutta R, Lee JC, Cook DN, Jung S, Lira SA, Littman DR, Ransohoff RM.** Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nature Neuroscience*. 9(7):917-24 (2006).
- Casas C, Sergeant N, Itier JM, Blanchard V, Wirths O, Van der Kolk N, Vingtdoux V, Van de Steeg E, Ret G, Canton T, Drobek H, Clark A, Bonici B, Delacouete A, Benavides J, Schmitz C, Tremp G, Bayer TA, Benoit P, Pradier L.** Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *The American Journal of Pathology*. 165(4):1289-300 (2004).
- Cataldo AM, Thayer CY, Bird ED, Wheelock TR, Nixon RA.** Lysosomal proteinase antigens are prominently localized within senile plaques of Alzheimer's disease: evidence for a neuronal origin. *Brain Research*. 513(2):181-92 (1990).
- Cataldo AM, Paskevich PA, Kominami E, Nixon RA.** Lysosomal hydrolases of different classes are abnormally distributed in brains of patients with Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 88(24):10998-1002 (1991).
- Cataldo AM, Barnett JL, Ertman SA, Li J, Quarless S, Bursztajn S, Lippa C, Nixon RA.** Gene expression and cellular content of cathepsin D in Alzheimer's disease brain: evidence for early up-regulation of the endosomal-lysosomal system. *Neuron*. 14(3):671-80 (1995).
- Cauli B, Audinat E, Lambolez B, Angulo MC, Ropert N, Tsuzuki K, Hestrin S, Rossier J.** Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *The Journal of Neuroscience*. 17(10):3894-906 (1995).
- Cauli B, Porter JT, Tsuzuki K, Lambolez B, Rossier J, Quenet B, Audinat E.** Classification of fusiform neocortical interneurons based on unsupervised clustering. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 97(11):6144-9 (2000).
- Chalecka-Franaszek E, Chuand DM.** Lithium activates the serine/threonine kinase Akt-1 and suppresses glutamate-induced inhibition of Akt-1 activity in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 96(15):8745-50 (1999).
- Chan-Palay V.** 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. *Journal of comparative neurology*. 260(2):201-23 (1987).
- Chao CC, Hu S, Sheng WS, Bu D, Bukrinsky MI, Peterson PK.** Cytokine-stimulated astrocytes damage human neurons via a nitric oxide mechanism. *Glia*. 16(3):276-84 (1996).
- Chen RW, Chuang DM.** Long term lithium treatment suppresses p53 and Bax expression but increases Bcl-2 expression. A prominent role in neuroprotection against excitotoxicity. *The Journal of Biological Chemistry*. 274(10):6039-42 (1999).
- Chen S, Averett NT, Manelli A, LaDu MJ, May W, Ard MD.** Isoform-specific effects of apolipoprotein E on secretion of inflammatory mediators in adult rat microglia. *Journal of Alzheimer's Disease*. 7(1):25-35 (2005).

- Chesneau V, Vekrellis K, Rosner MR, Selkoe DJ.** Purified recombinant insulin-degrading enzyme degrades amyloid beta-protein but does not promote its oligomerization. *The Biochemical Journal*. 351(2):509-16 (2000).
- Chin J, Massaro CM, Palop JJ, Thwin MT, Yu GQ, Bien-Ly N, Bender A, Mucke L.** Reelin depletion in the entorhinal cortex of human amyloid precursor protein transgenic mice and humans with Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience*. 27(11):2727-33 (2007).
- Chishti MA, Yang DS, Janus C, Phinney AL, Horne P, Pearson J, Strome R, Zuker N, Loukides J, French J, Turner S, Lozza G, Grilli M, Kunicki S, Morissette C, Paquette J, Gervais F, Bergeron C, Fraser PE, Carlson GA, Goerge-Hyslop PS, Westaway D.** Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *The Journal of Biological Chemistry*. 276(24):21562-70 (2001).
- Chiu IM, Chen A, Zheng Y, Kosaras B, Tsiftoglou SA, Vartanian TK, Brown RH Jr, Carroll MC.** T lymphocytes potentiate endogenous neuroprotective inflammation in a mouse model of ALS. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*. 105(46):17913-8 (2008).
- Choi P, Reiser H.** IL-4: role in disease and regulation of production. *Clinical and Experimental Immunology*. 113(3):317-9 (1998).
- Christensen DZ, Kraus SL, Flohr A, Cotel MC, Wirths O, Bayer TA.** Transient intraneuronal A β rather than extracellular plaque pathology correlates with neuron loss in the frontal cortex of APP/PS1KI mice. *Acta Neuropathology*. 116(6):647-55 (2008).
- Chrobak JJ, Amaral DG.** Entorhinal cortex of the monkey: VII. intrinsic connections. *The Journal of Comparative Neurology*. 500(4):612-33 (2007).
- Chronwall BM, Chase TN, O'Donohue TL.** Coexistence of neuropeptide Y and somatostatin in rat and human cortical and rat hypothalamic neurons. *Neuroscience Letters*. 52(3):213-7 (1984).
- Chuang DM.** The antiapoptotic actions of mood stabilizers: molecular mechanisms and therapeutic potentials. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1053:195-204 (2005).
- Cirrito JR, Yamada KA, Finn MB, Sloviter RS, Bales KR, May PC, Schoepp DD, Paul SM, Mennerick S, Holtzman DM.** Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. *Neuron*. 48(6):913-22 (2005).
- Cirrito JR, Kang JE, Lee J, Stewart FR, Verges DK, Silverio LM, Bu G, Mennerick S, Holtzman DM.** Endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of amyloid-beta in vivo. *Neuron*. 58(1):42-51 (2008).
- Colton CA, Mott RT, Sharpe H, Xu Q, Van Nostrand WE, Vitek MP.** Expression profiles for macrophage alternative activation genes in AD and in mouse models of AD. *Journal of Neuroinflammation*. 3:27 (2006a).
- Colton CA, Vitek MP, Wink DA, Xu Q, Catillana V, Previti ML, Nostrand WE, Weinberg JB, Dawson H.** NO synthase 2 (NOS2) deletion promotes multiple pathologies in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*. 103(34):12867-72 (2006b).
- Combs CK, Karlo JC, Kao SC, Landreth GE.** Beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *The Journal of Neuroscience*. 21(4):1179-88 (2001).
- Cossart R, Dinocourt C, Hirsch JC, Merchan-Perez A, DeFelipe J, Ben-Ari Y, Esclapez M, Bernard C.** Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy. *Nature Neuroscience*. 4(1):52-62 (2001).
- Craft JM, Watterson DM, Van Eldik LJ.** Human amyloid beta-induced neuroinflammation is an early event in neurodegeneration. *Glia*. 53(5):484-90 (2006).
- Craft S, Asthana S, Newcomer JW, Wilkinson CW, Matos IT, Baker LD, Cherrier M, Lofgreen C, Latendresse S, Petrova A, Plymate S, Raskind M, Grimwood K, Veith RC.** Enhancement of memory in Alzheimer disease with insulin and somatostatin, but not glucose. *Archives of General Psychiatry*. 56(12):1135-40 (1999).
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA.** Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 378(6559):785-9 (1995).
- Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D.** Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science*. 305(5688):1292-5 (2004).
- Culmsee C, Landshamer S.** Molecular insights mechanisms of the cell death program: role in the progression of neurodegenerative disorders. *Current Alzheimer Research*. 3(4):269-83 (2006).
- Czech C, Tremp G, Pradier L.** Presenilins and Alzheimer's disease: biological functions and pathogenic mechanism. *Process in Neurobiology*. 60:363-384 (2000).

Bibliografía

- Dai Q, Borestein AM, Wu Y, Jackson JC, Larson EB.** Fruit and vegetable juices and Alzheimer's disease: The Kame project. *The American Journal of Medicine*. 199:751-759 (2006).
- D'Andrea MR, Nagele RG, Wang HY, Peterson PA, Lee DH.** Evidence that neurones accumulating amyloid can undergo lysis to form amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Histopathology*. 38(2):120-34 (2001).
- D'Andrea MR, Nagele RG, Wang HY, Lee DH.** Consistent immunohistochemical detection of intracellular beta-amyloid42 in pyramidal neurons of Alzheimer's disease entorhinal cortex. *Neuroscience Letters*. 333(3):163-6 (2002).
- Davis KL, Mohs RC, Marin DB, Purohit DP, Perl DP, Lantz M, Austin G, Haroutunian V.** Neuropeptide abnormalities in patients with early Alzheimer disease. *Archives of General Psychiatry*. 56(11):981-7 (1999).
- Davies P, Katzman R, Terry RD.** Reduced somatostatin-like immunoreactivity in cerebral cortex from cases of Alzheimer disease and Alzheimer senile dementia. *Nature*. 288(5788):279-80 (1980).
- Deane R, Zlokovic BV.** Role of the blood-brain barrier in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*. 4(2):191-7 (2007).
- De Curtis M, Paré D.** The rhinal cortices: a wall of inhibition between the neocortex and the hippocampus. *Progress in Neurobiology*. 74(2):101-10 (2004).
- De Felice FG, Vieira MN, Saraiva LM, Figueroa-Villar JD, Garcia-Abreu J, Liu R, Chang L, Klein WL, Ferreira ST.** Targeting the neurotoxic species in Alzheimer's disease: inhibitors of Abeta oligomerization. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 18(12):1366-72 (2004).
- DeFelipe J, Hendry SH, Jones EG.** Synapses of double bouquet cells in monkey cerebral cortex visualized by calbindin immunoreactivity. *Brain Research*. 503(1):49-54 (1989).
- DeFelipe J, Hendry SH, Hashikawa T, Molinari M, Jones EG.** A microcolumnar structure of monkey cerebral cortex revealed by immunocytochemical studies of double bouquet cell axons. *Neuroscience*. 37(3):655-73 (1990).
- DeFelipe J, Fariñas I.** The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Progress in Neurobiology*. 39(6):563-607 (1992).
- DeFelipe J.** Neocortical neuronal diversity: chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins, and cell surface molecules. *Cerebral Cortex*. 3(4):273-89 (1993).
- DeFelipe J.** Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 14(1):1-19 (1997).
- DeFelipe J.** Chandelier cells and epilepsy. *Brain*. 122(10):1807-22 (1999).
- DeFelipe J.** Cortical interneurons: from Cajal to 2001. *Progress in Brain Research*. 136:215-38 (2002).
- De Jong EK, Dijkstra IM, Hensens M, Brouwer N, Van Amerongen M, Liem RS, Boddeke HW, Biber K.** Vesicle-mediated transport and release of CCL21 in endangered neurons: a possible explanation for microglia activation remote from a primary lesion. *The Journal of Neuroscience*. 25(33):7548-57 (2005).
- De la Torre JC.** How do heart disease and stroke become risk factors for Alzheimer's disease?. *Neurological Research*. 28(6):637-644 (2006).
- Deller T, Martinez A, Nitsch R, Frotscher M.** A novel entorhinal projection to the rat dentate gyrus: direct innervation of proximal dendrites and cell bodies of granule cells and GABAergic neurons. *The Journal of Neuroscience*. 16(10):3322-33 (1996).
- Del Rio MR, DeFelipe J.** Synaptic connections of calretinin-immunoreactive neurons in the human neocortex. *The Journal of Neuroscience*. 17(13):5143-54 (1997).
- Deng JB, Yu DM, Li MS.** Formation of the entorhino-hippocampal pathway: a tracing study in vitro and in vivo. *Neuroscience Bulletin*. 22(6):305-14 (2006).
- Deng JB, Yu DM, Wu P, Li MS.** The tracing study of developing entorhino-hippocampal pathway. *International Journal of developmental Neuroscience*. 25(4):251-8 (2007).
- Desai BS, Monahan AJ, Carvey PM, Hendey B.** Blood-brain barrier pathology in Alzheimer's and Parkinson's disease: implications for drug therapy. *Cell Transplantation*. 16(3):285-99 (2007).
- De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, Von Figura K, Van Leuven F.** Deficiency of presenilina-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*. 391(6665):337-40 (1998).

- De Toledo Morrell L, Goncharova I, Dickerson B, Wilson RS, Bennett DA.** From healthy aging to early Alzheimer's disease: in vivo detection of entorhinal cortex atrophy. *Annals of the New York Academy of Science*. 911:240-53 (2000).
- De Toledo Morrell L, Stoub TR, Bulgakova M, Wilson RS, Bennett DA, Leurgans S, Wu J, Turner DA.** MRI-derived entorhinal volume is a good predictor of conversion from MCI to AD. *Neurobiology of Aging*. 25(9):1197-203 (2004).
- Devanand DP, Pradhaban G, Liu X, Khandji A, De Santi S, Segal S, Rusinek H, Pelton GH, Honig LS, Mayeux R, Stern Y, Tabert MH, de Leon MJ.** Hippocampal and entorhinal atrophy in mild cognitive impairment: prediction of Alzheimer disease. *Neurology*. 68(11):828-36 (2007).
- DiCarlo G, Wilcock DM, Henderson D, Gordon MN, Morgan D.** Intrahippocampal LPS injections reduce Abeta load in APP+PS1 transgenic mice. *Neurobiology of Aging*. 22(6):1007-12 (2001).
- Dickson DW.** The pathogenesis of senile plaques. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 56(4):321-39 (1997).
- Dolorfo CL, Amaral DG.** Entorhinal cortex of the rat: organization of intrinsic connections. *The Journal of Comparative Neurology*. 398(1):49-82 (1998a).
- Dolorfo CL, Amaral DG.** Entorhinal cortex of the rat: topographic organization of the cells of origin of the perforant path projection to the dentate gyrus. *The Journal of Comparative Neurology*. 398(1):25-48 (1998b).
- Dominguez DI, De Strooper.** Novel therapeutic strategies provide the real test for the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*. 23(7):324-30 (2002).
- Donahue JE, Johanson CE.** Apolipoprotein E, amyloid-beta, and blood-brain barrier permeability in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 67(4):261-70 (2008).
- Dournaud P, Delaere P, Hauw JJ, Epelbaum J.** Differential correlation between neurochemical deficits, neuropathology, and cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 16(5):817-23 (1995).
- Du AT, Schuff N, Amend D, Laakso MP, Hsu YY, Jagust WJ, Yaffe K, Kramer JH, Reed BR, Norman D, Chui HC, Weiner MW.** Magnetic resonance imaging of the entorhinal cortex and hippocampus in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, neurosurgery and psychiatry*. 71(4):441 (2001).
- Du AT, Schuff N, Zhu XP, Jagust WJ, Miller BL, Reed BR, Kramer JH, Mungas D, Yaffe K, Chui HC, Weiner MW.** Atrophy rates of entorhinal cortex in AD and normal aging. *Neurology*. 60(3):481-6 (2003).
- Du AT, Schuff N, Kramer JH, Ganzer S, Zhu XP, Jagust WJ, Miller BL, Reed BR, Mungas D, Yaffe K, Chui HC, Weiner MW.** Higher atrophy rate of entorhinal cortex than hippocampus in AD. *Neurology*. 62(3):422-427 (2004).
- Dudal S, Morissette C, Lacombe D, Tremblay P, Gervais F.** Differences in the amyloid-beta-induced inflammatory response in microglia from C57BL/6 and A/J strains of mice. *Journal of Neuroimmunology*. 153(1-2):26-35 (2004).
- Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y, Yager D, Morgan D, Gordon MN, Holcomb L, Refolo L, Zenk B, Hardy J, Younkin S.** Increased amyloid-beta₄₂(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature*. 383(6602):710-3 (1996).
- Duff K, Knight H, Refolo L, Sanders S, Yu X, Picciano M, Malester B, Hutton M, Adamson J, Goedert M, Burki K, Davies P.** Characterization of pathology in transgenic mice over-expressing human genomic and cDNA tau transgenes. *Neurobiology of Disease*. 7(2):87-98 (2000).
- Duque Correa MA, Rojas Lopez M.** Alternative macrophage activation: the diversity of one cell involved in innate immunity in response to its environmental complexity. *Inmunologia*. 26(2):73-86 (2007).
- Duyckaerts C.** Looking for the link between plaques and tangles. *Neurobiology of Aging*. 25:735-739 (2004).
- Duyckaerts C, Potier MC, Delatour B.** Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathologica*. 115(1):5-38 (2008).
- Eaton K, Sallee FR, Sah R.** Relevance of neuropeptide Y (NPY) in psychiatry. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 7(17):1645-59 (2007).
- Edwards MM, Robinson SR.** TNF alpha affects the expression of GFAP and S100B: implications for Alzheimer's disease. *Journal of Neuronal Transmission*. 1709-15 (2006).
- El Khoury J, Toft M, Hickman SE, Means TK, Terada K, Geula C, Luster AD.** Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nature Medicine*. 13(4):432-8 (2007).

Bibliografía

- El Khoury J, Luster AD.** Mechanisms of microglia accumulation in Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Trends in Pharmacological Sciences*. 29(12):626-32 (2008).
- Elyaman W, Terro F, Wong NS, Hugon J.** In vivo activation and nuclear translocation of phosphorylated glycogen synthase kinase-3 β in neuronal apoptosis: links to tau phosphorylation. *The European Journal of Neuroscience*. 15(4):651-60 (2002).
- Eriksen JL, Sagi SA, Smith TE, Weggen S, Das P, McLendon DC, Ozols VV, Jessing KW, Zavitz KH, Koo EH, Golde TE.** NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target gamma-secretase and lower Abeta 42 in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*. 112(3):440-9 (2003).
- Evin G, Weidemann A.** Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptides. *Peptides*. 23(7):1285-97 (2002).
- Fairen A, Valverde F.** A specialized type of neuron in the visual cortex of cat: a Golgi and electron microscope study of chandelier cells. *The Journal of Comparative Neurology*. 194(4):761-79 (1980).
- Fairen A, DeFelipe J, Regidor J.** Nonpyramidal neurons: general account. *Cerebral Cortex*. Vol. 1, A. Peters and E. G. Jones, eds. (New York, NY, Plenum Press), pp. 201-245 (1984).
- Fairen A, Morante-Oria J, Frassoni C.** The surface of the developing cerebral cortex: still special cells one century later. *Progress in Brain Research*. 136:281-91 (2002).
- Farfara D, Lifshitz V, Frenkel D.** Neuroprotective and neurotoxic properties of glial cells in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 12(3):762-80 (2008).
- Farris W, Schütz SG, Cirrito JR, Shankar GM, Sun X, George A, Leissring MA, Walsh DM, Qiu WQ, Holtzman DM, Selkoe DJ.** Loss of neprilysin function promotes amyloid plaque formation and causes cerebral amyloid angiopathy. *The American Journal of Pathology*. 171(1):241-51 (2007).
- Fernandez M, Segura MF, Sole C, Colino A, Comella JX, Ceña V.** Lifeguard/neuronal membrane protein 35 regulates Fas ligand-mediated apoptosis in neurons via microdomain recruitment. *Journal of Neurochemistry*. 103(1):190-203 (2007).
- Ferreiro E, Oliveira CR, Pereira CM.** The release of calcium from the endoplasmic reticulum induced by amyloid-beta and prion peptides activates the mitochondrial apoptotic pathway. *Neurobiology of Disease*. 30(3):331-42 (2008).
- Ferrer I, Soriano E, Tuñón T, Fonseca M, Guionnet N.** Parvalbumin immunoreactive neurons in normal human temporal neocortex and in patients with Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences*. 106(2):135-41 (1991).
- Feyt C, Kienlen-Campard P, Leroy K, N'Kuli F, Courttoy PJ, Brion JP, Octave JN.** Lithium chloride increases the production of amyloid-beta peptide independently from its inhibition of glycogen synthase kinase 3. *The Journal of Biological Chemistry*. 280(39):33220-7 (2005).
- Fiala M, Zhang L, Gan X, Sherry B, Taub D, Graves MC, Hama S, Way D, Weinand M, Witte M, Lorton D, Kuo YM, Roher AE.** Amyloid-beta induces chemokine secretion and monocyte migration across a human blood-brain barrier model. *Molecular Medicine*. 4(7):480-9 (1998).
- Flood JF, Hernandez EN, Morley JE.** Modulation of memory processing by neuropeptide Y. *Brain Research*. 421(1-2):280-90 (1987).
- Florio T, Ventra C, Postiglione A, Schettini G.** Age-related alterations of somatostatin gene expression in different rat brain areas. *Brain Research*. 557(1-2):64-8 (1991).
- Fogal B, Hewett SJ.** Interleukin-1 β : a bridge between inflammation and excitotoxicity? *Journal of Neurochemistry*. 106(1):1-23 (2008).
- Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR.** "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of Psychiatric Research*. 12(3):189-98 (1975).
- Fonseca M, Soriano E.** Calretinin-immunoreactive neurons in the normal human temporal cortex and in Alzheimer's disease. *Brain Research*. 691(1-2):83-91 (1995).
- Forman MS, Trojanowski JQ, Lee VM.** Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paver for therapeutic breakthroughs. *Nature Medicine*. 10(10):1055-63 (2004).
- Fornai F, Longone P, Cafaro L, Kastsiuchenka O, Ferrucci M, Manca ML, Lazzeri G, Spalloni A, Bellio N, Lenzi P, Modugno N, Siciliano G, Isidoro C, Murri L, Ruggieri S, Paparelli A.** Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 105(6):2052-7 (2008).
- Franklin KBJ, Paxinos G.** The mouse brain in stereotaxic coordinates. *Academic Press*. (2008).

- Frautschy SA, Cole GM, Baird A.** Phagocytosis and deposition of vascular beta-amyloid in rat brains injected with Alzheimer beta-amyloid. *The American Journal of Pathology*. 140(6):1389-99 (1992).
- Freund TF, Buzsaki G.** Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*. 6(4):347-470 (1996).
- Friendland RP.** Fish consumption and the risk of Alzheimer disease. *Archives of Neurology*. 60(7):923-4 (2003).
- Funato H, Yoshimura M, Yamazaki T, Saido TC, Ito Y, Yokofujita J, Okeda R, Ihara Y.** Astrocytes containing amyloid beta-protein (Abeta)-positive granules are associated with Abeta40-positive diffuse plaques in the aged human brain. *The American Journal of Pathology*. 152(4):983-92 (1998).
- Furtak SC, Wei SM, Agster KL, Burwell RD.** Functional neuroanatomy of the parahippocampal region in the rat: the perirhinal and postrhinal cortices. *Hippocampus*. 17(9):709-22 (2007).
- Gabrial SM, Bierer LM, Harotunian V, Purohit DP, Perl DP, Davis KL.** Widespread deficits in somatostatin but not neuropeptide Y concentrations in Alzheimer's disease cerebral cortex. *Neuroscience Letters*. 155(1):116-20 (1993).
- Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemmens J, Donaldson T, Gillespie F, Guido T, Hagopian S, Johnson-Wood K, Khan K, Lee M, Leibowitz P, Lieberburg I, Little S, Masliah E, McConlogue L, Montoya-Zavala M, Mucke L, Paganini L, Penniman E, Power M, Schenk D, Seubert P, Snyder B, Soriano F, Tan H, Vitale J, Wadsworth S, Wolozin B, Zhao J.** Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature*. 373(6514):523-7 (1995).
- Gaspar P, Duyckaerts C, Febvret A, Benoit R, Beck B, Berger B.** Subpopulations of somatostatin 28-immunoreactive neurons display different vulnerability in senile dementia of the Alzheimer type. *Brain Research*. 490(1):1-13 (1989).
- Gauthier E, Fortier I, Courchesne F, Pepin P, Mortimer J, Gauvreau D.** Aluminium forms in drinking water and risk of Alzheimer's disease. *Environmental Research*. 84(3):234-46 (2000).
- Gavilan MP, Revilla E, Pintado C, Castaño A, Vizuete ML, Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Vitorica J, Gutierrez A, Ruano D.** Molecular and cellular characterization of the age-related neuroinflammatory processes occurring in normal rat hippocampus: potential relation with the loss of somatostatin GABAergic neurons. *Journal of Neurochemistry*. 103(3):984-96 (2007).
- Gazzaley AH, Thakker MM, Hof PR, Morrison JH.** Preserved number of entorhinal cortex layer II neurons in aged macaque monkeys. *Neurobiology of Aging*. 18(5):549-53 (1997).
- Germroth P, Schwerdtfeger WK, Buhl EH.** Morphology of identified entorhinal neurons projecting to the hippocampus. A light microscopical study combining retrograde tracing and intracellular injection. *Neuroscience*. 30(3):683-91 (1989).
- Giannakopoulos P, Hof PR, Bouras C.** Selective vulnerability of neocortical association areas in Alzheimer's disease. *Microscopy Research and Technique*. 43(1):16-23 (1998).
- Gilmour J, Lavender P.** Control of IL-4 expression in T helper 1 and 2 cells. *Immunology*. 124(4):437-44 (2008).
- Gloveli T, Schmitz D, Empson RM, Dugladze T, Heinemann U.** Morphological and electrophysiological characterization of layer III cells of the medial entorhinal cortex of the rat. *Neuroscience*. 77(3):629-48 (1997).
- Gloveli T, Dugladze T, Schmitz D, Heinemann U.** Properties of entorhinal cortex deep layer neurons projecting to the rat dentate gyrus. *The European Journal of Neuroscience*. 13(2):413-20 (2001).
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, Mant R, Newton P, Rooke K, Roques P, Talbot C, Pericak-Vance M, Roses A, Williamson R, Rossor M, Owen M, Hardy J.** Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. 349(6311):704-6 (1991).
- Gomez-Isla T, Price JL, McKeel DW Jr, Morris JC, Growdon JH, Hyman BT.** Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience*. 16(14):4491-500 (1996).
- Gonchar Y, Burkhalter A.** Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex. *Cerebral Cortex*. 7(4):347-58 (1997).
- Gonchar Y, Burkhalter A.** Connectivity of GABAergic calretinin-immunoreactive neurons in rat primary visual cortex. *Cerebral Cortex*. 9(7):683-96 (1999).
- Gonchar Y, Burkhalter A.** Distinct GABAergic targets of feedforward and feedback connections between lower and higher areas of rat visual cortex. *The Journal of Neuroscience*. 23(34):10904-12 (2003).
- Gonchar Y, Wang Q, Burkhalter A.** Multiple distinct subtypes of GABAergic neurons in mouse visual cortex identified by triple immunostaining. *Frontiers in Neuroanatomy*. 1:3 (2008).

Bibliografía

- Gonzalez-Albo MC, Elston GN, DeFelipe J.** The human temporal cortex: characterization of neurons expressing nitric oxide synthase, neuropeptides and calcium-binding proteins, and their glutamate receptor subunit profiles. *Cerebral Cortex*. 11(12):1170-81 (2001).
- Götz J, Probst A, Spillantini MG, Schäfer T, Jakes R, Bürki K, Goedert M.** Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *The EMBO Journal*. 14(7):1304-13 (1995).
- Götz J.** Tau and transgenic animal models. *Brain Research Reviews*. 35(3):266-86 (2001).
- Gouras GK, Tsai J, Naslund J, Vincent B, Edgar M, Checler F, Greenfield JP, Haroutunian V, Buxbaum JD, Xu H, Greengard P, Relkin NR.** Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *The American Journal of Pathology*. 156(1):15-20 (2000).
- Griffin WS, Stanley LC, Ling C, White L, MacLeod V, Perrot LJ, White CL 3rd, Araoz C.** Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*. 86(19):7611-5 (1989).
- Griffin WS, Sheng JG, Poyston MC, Gentleman SM, McKenzie JE, Graham DI, Roberts GW, Mrak RE.** Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression. *Brain Pathology*. 8(1):65-72 (1998).
- Griffin WS, Mrak RE.** Interleukin-1 in the genesis and progression of and risk for development of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Journal of Leukocyte Biology*. 72(2):233-8 (2002).
- Griffin WS.** Inflammation and neurodegenerative disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 83(2):470-74S (2006).
- Grouselle D, Winsky-Sommerer R, David JP, Delacourte A, Dournaud P, Epelbaum J.** Loss of somatostatin-like immunoreactivity in the frontal cortex of Alzheimer patients carrying the apolipoprotein epsilon 4 allele. *Neuroscience Letters*. 255(1):21-4 (1998).
- Gundersen HJ, Jensen EB, Kieu K, Nielsen J.** The efficiency of systematic sampling in stereology-reconsidered. *Journal of Microscopy*. 193(Pt 3):199-2 (1999).
- Guo Q, Sopher BL, Furukawa K, Pham DG, Robinson N, Martin GM, Mattson MP.** Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid beta-peptide: involvement of calcium and oxyradicals. *The Journal of Neuroscience*. 17(11):4212-22 (1997).
- Gupta A, Wang Y, Markram H.** Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science*. 287(5451):273-8 (2000).
- Gustaw KA, Garrett MR, Lee HG, Castellani RJ, Zagorski MG, Prakasam A, Siedlak SL, Zhu X, Perry G, Petersen RB, Friedland RP, Smith MA.** Antigen-antibody dissociation in Alzheimer disease: a novel approach to diagnosis. *Journal of Neurochemistry*. 106(3):1350-6 (2008).
- Haass C, Selkoe DJ.** Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*. 8(2):101-12 (2007).
- Hachinski V, Muñoz DG.** Cerebrovascular pathology in Alzheimer's disease: cause, effect or epiphenomenon? *Annals of the New York Accademy of Science*. 26:826:1-6 (1997).
- Hama E, Saido TC.** Etiology of sporadic Alzheimer's disease: somatostatina, neprelysin and amyloid beta peptide. *Medical Hypotheses*. 65(3):498-500 (2005).
- Hamam BN, Kennedy TE, Alonso A, Amaral DG.** Morphological and electrophysiological characteristics of layer V neurons of the rat medial entorhinal cortex. *The Journal of Comparative Neurology*. 418(4):457-72 (2000).
- Hamam BN, Amaral DG, Alonso A.** Morphological and electrophysiological characteristics of layer V neurons of the rat lateral entorhinal cortex. *The Journal of Comparative Neurology*. 451(1):45-61 (2002).
- Hanish UK, Kettenmann H.** Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neuroscience*. 10(11):1387-94 (2007).
- Hansen LA, Masliah E, Quijada-Fawcett S, Rexin D.** Entorhinal neurofibrillary tangles in Alzheimer disease with Lewy bodies. *Neuroscience Letters*. 129(2):269-72 (1991).
- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N.** Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*. 441(7095):885-9 (2006).
- Hardy J, Selkoe DJ.** The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 297(5580):353-6 (2002).

- Haroutunian V, Mantin R, Campbell GA, Tsuboyama GK, Davis KL.** Cysteamine-induced depletion of central somatostatin-like immunoactivity: effects on behavior, learning, memory and brain neurochemistry. *Brain Research*. 403(2):234-42 (1987).
- Hashimoto R, Takei N, Shimazu K, Christ L, Lu B, Chuang DM.** Lithium induces brain-derived neurotrophic factor and activates TrkB in rodent cortical neurons: an essential step for neuroprotection against glutamate excitotoxicity. *Neuropharmacology*. 43(7):1173-9 (2002).
- He P, Zhong Z, Lindholm K, Berning L, Lee W, Lemere C, Staufenbiel M, Li R, Shen Y.** Deletion of tumor necrosis factor death receptor inhibits amyloid beta generation and prevents learning and memory deficits in Alzheimer's mice. *The Journal of Cell Biology*. 178(5):829-41 (2007).
- Heber AE, Dash PK.** Nonredundant roles for hippocampal and entorhinal cortical plasticity in spatial memory storage. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*. 79(1):143-53 (2004).
- Heinemann U, Schmitz D, Eder C, Gloveli T.** Properties of entorhinal cortex projection cells to the hippocampal formation. *Annals of the New York Accademy of Science*. 911:112-26 (2000).
- Heizman CW, Braun K.** Changes in Ca(2+)-binding proteins in human neurodegenerative disorders. *Trends in Neurosciences*. 15(7):259-64 (1992).
- Hendry SH, Jones EG, Emson PC.** Morphology, distribution, and synaptic relations of somatostatin- and neuropeptide Y-immunoreactive neurons in rat and monkey neocortex. *The Journal of Neuroscience*. 4(10):2497-517 (1984a).
- Hendry SH, Jones EG, DeFelipe J, Schmechel D, Brandon C, Emson PC.** Neuropeptide-containing neurons of the cerebral cortex are also GABAergic. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*. 81(20):6526-30 (1984b).
- Heneka MT, Wiesinger H, Dumitrescu-Ozimek L, Riederer P, Feinstein DL, Klockgether T.** Neuronal and glial coexpression of argininosuccinate synthetase and inducible nitric oxide synthase in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 60(9):906-16 (2001).
- Heneka MT, O'Banion MK.** Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroimmunology*. 184(1-2):69-91 (2007).
- Herber DL, Roth LM, Wilson D, Wilson N, Mason JE, Morgan D, Gordon MN.** Time-dependent reduction in Abeta levels after intracranial LPS administration in APP transgenic mice. *Experimental Neurology*. 190(1):245-53 (2004).
- Hirano A, Zimmerman HM.** Alzheimer's neurofibrillary changes. A topographic study. *Archives of Neurology*. 7:227-42 (1962).
- Hirano A.** Hirano bodies and related neuronal inclusions. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 20(1):3-11 (1994).
- Hoe HS, Rebeck GW.** Functional interactions of APP with ApoE receptor family. *Journal of Neurochemistry*. 106(6):2263-71 (2008).
- Hof PR, Cox K, Young WG, Celio MR, Rogers J, Morrison JH.** Parvalbumin-immunoreactive neurons in the neocortex are resistant to degeneration in Alzheimer's disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 50(4):451-62 (1991).
- Hof PR, Bierer LM, Perl DP, Delacourte A, Buee L, Bouras C, Morrison JH.** Evidence for early vulnerability of the medial and inferior aspects of the temporal lobe in an 82-year-old patient with preclinical signs of dementia. Regional and laminar distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques. *Archives of Neurology*. 49(9):946-53 (1992).
- Hof PR, Bussiere T, Gold G, Kovari E, Giannakopoulos P, Bouras C, Perl DP, Morrison JH.** Stereologic evidence for persistence of viable neurons in layer II of the entorhinal cortex and CA1 field in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 62(1):55-67 (2003).
- Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, Wright K, Saad I, Mueller R, Morgan D, Sanders S, Zehr C, O'Campo K, Hardy J, Prada CM, Eckman C, Younkin S, Hsiao K, Duff K.** Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nature Medicine*. 4(1):97-100 (1998).
- Hölscher C.** Possible causes of Alzheimer's disease: amyloid fragments, free radicals, and calcium homeostasis. *Neurobiology of Disease*. 5(3):129-41 (1998).
- Hopkins SJ, Rothwell NJ.** Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. *Trends in Neurosciences*. 18(2):83-8 (1995).
- Howlett DR, Bowler K, Soden PE, Riddell D, Davis JB, Richardson JC, Burbidge SA, Gonzalez MI, Irving EA, Lawman A, Miglio G, Dawson EL, Howlett ER, Hussain I.** Abeta deposition and related pathology in

Bibliografía

- an APP x PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Histology and Histopathology*. 23(1):67-76 (2008).
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G.** Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*. 274(5284):99-102 (1996).
- Hu J, Akama KT, Krafft GA, Chromy BA, Van Eldik LJ.** Amyloid-beta peptide activates cultured astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release. *Brain Research*. 785(2):195-206 (1998).
- Huang ZJ, Di Cristo G, Ango F.** Development of GABA innervation in the cerebral and cerebellar cortices. *Nature Reviews Neuroscience*. 8(9):673-86 (2007).
- Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR, Barnes CL.** Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science*. 225(4667):1168-70 (1984).
- Hyman BT, Van Hoesen GW, Kromer LJ, Damasio AR.** Perforant pathway changes and the memory impairment of Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*. 20(4):472-81(1986).
- Iijima K, Ando K, Takeda S, Satoh Y, Seki T, Itohara S, Greengard P, Kirino Y, Nairn AC, Suzuki T.** Neuron-specific phosphorylation of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein by cyclin-dependent kinase 5. *Journal of Neurochemistry*. 75(3):1085-91 (2000).
- Inoue K, Koizumi S, Tsuda M.** The role of nucleotides in the neuron--glia communication responsible for the brain functions. *Journal of Neurochemistry*. 102(5):1447-58 (2007).
- Insausti R, Herrero MT, Witter MP.** Entorhinal cortex of the rat: cytoarchitectonic subdivisions and the origin and distribution of cortical efferents. *Hippocampus*. 7(2):146-83 (1997).
- Insausti R, Amaral DG.** Entorhinal cortex of the monkey: IV. Topographical and laminar organization of cortical afferents. *The Journal of Comparative Neurology*. 509(6):608-41 (2008).
- Iqbal K, Grundke-Iqbal I.** Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, ethiopathogenesis, therapeutics and prevention. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 12(1):38-55 (2008).
- Itagaki S, McGeer PL, Akiyama H, Zhu S, Selkoe D.** Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *Journal of Neuroimmunology*. 24(3):173-82 (1989).
- Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Hama E, Lee HJ, Saido TC.** Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science*. 292(5521):1550-2 (2001).
- Jacobsen JS, Wu CC, Redwine JM, Comery TA, Arias R, Bowlby M, Martone R, Morrison JH, Pangalos MN, Reinhart PH, Bloom FE.** Early-onset behavioural and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 103(13):5161-6 (2006).
- Janelins MC, Mastrangelo MA, Oddo S, LaFerla FM, Federoff HJ, Bowers WJ.** Early correlation of microglial activation with enhanced tumor necrosis factor-alpha and monocyte chemoattractant protein-1 expression specifically within the entorhinal cortex of triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Journal of Neuroinflammation*. 2:23 (2005).
- Jankowsky JL, Slunt HH, Gonzales V, Savonenko AV, Wen JC, Jenkins NA, Copeland NG, Younkin LH, Lester HA, Younkin SG, Borchelt DR.** Persistent amyloidosis following suppression of Abeta production in a transgenic model of Alzheimer disease. *PLoS Medicine*. 2(12):e355 (2005).
- Jiang ZJ, Richardson JS, Yu PH.** The contribution of cerebral vascular semicarbazide-sensitive amine oxidase to cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 34(2):194-204 (2008).
- Jimenez S, Baglietto-Vargas D, Caballero C, Moreno-Gonzalez I, Torres M, Sanchez-Varo R, Ruano D, Vizuete M, Gutierrez A, Vitorica J.** 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. *Journal of Neuroscience*. 28(45): 11650-61 (2008).
- Johnson KA, Jones K, Holman BL, Becker JA, Spiers PA, Satlin A, Albert MS.** Preclinical prediction of Alzheimer's disease using SPECT. *Neurology*. 50(6):1563-71 (1998).
- Johnson SC, Saykin AJ, Baxter LC, Flashman LA, Santulli RB, McAllister TW, Mamourian AC.** The relationship between fMRI activation and cerebral atrophy: comparison of normal aging and alzheimer disease. *Neuroimage*. 11(3):179-87 (2000).
- Johnstone M, Gearing AJ, Miller KM.** A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. *Journal of Neuroimmunology*. 93(1-2):182-93 (1999).
- Jones BF, Witter MP.** Cingulate cortex projections to the parahippocampal region and hippocampal formation in the rat. *Hippocampus*. 17(10):957-76 (2007).

- Jones RS.** Entorhinal-hippocampal connections: a speculative view of their function. *Trends in Neuroscience*. 16(2):58-64 (1993).
- Jones RS.** Synaptic and intrinsic properties of neurons of origin of the perforant path in layer II of the rat entorhinal cortex in vitro. *Hippocampus*. 4(3):335-53 (1994).
- Juottonen K, Laakso MP, Insausti R, Lehtovirta M, Pitkänen A, Partanen K, Soininen H.** Volumes of the entorhinal and perirhinal cortices in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 19(1):15-22 (1998).
- Juottonen K, Laakso MP, Partanen K, Soininen H.** Comparative MR analysis of the entorhinal cortex and hippocampus in diagnosing Alzheimer disease. *American Journal of Neuroradiology*. 20(1):139-44 (1999).
- Kajiwarra R, Wouterlood FG, Sah A, Boekel AJ, Baks.te Bulte LT, Witter MP.** Convergence of entorhinal and CA3 inputs onto pyramidal neurons and interneurons in hippocampal area CA1--an anatomical study in the rat. *Hippocampus*. 18(3):266-80 (2008).
- Katzman R.** Editorial: The prevalence and malignancy of Alzheimer's disease. A major killer. *Archives of Neurology*. 33(4):217-8 (1976).
- Kawaguchi Y, Kubota Y.** Correlation of physiological subgroupings of nonpyramidal cells with parvalbumin- and calbindinD28k-immunoreactive neurons in layer V of rat frontal cortex. *Journal of Neurophysiology*. 70(1):387-96 (1993).
- Kawaguchi Y, Kubota Y.** GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cerebral Cortex*. 7(6):476-86 (1997).
- Kawaguchi Y, Kubota Y.** Neurochemical features and synaptic connections of large physiologically-identified GABAergic cells in the rat frontal cortex. *Neuroscience*. 85(3):677-701 (1998).
- Kawaguchi Y, Kondo S.** Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex. *Journal of Neurocytology*. 31(3-5):277-87 (2002).
- Kawas CH.** Medications and diet protective factors for AD? *Alzheimer Disease and Associated Disorders*. 20(2):89-96 (2006).
- Kerr KM, Agster KL, Furtak SC, Burwell RD.** Functional neuroanatomy of the parahippocampal region: the lateral and medial entorhinal areas. *Hippocampus*. 17(9):697-708 (2007).
- Khachaturian ZS.** Diagnosis of Alzheimer's disease. *Archives of Neurology*. 42(11):1097-105 (1985).
- Kim TS, Lim HK, Lee JY, Kim DJ, Park S, Lee C, Lee CU.** Changes in the levels of plasma soluble fractalkine in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*. 436(2):196-200 (2008).
- Klein PS, Melton DA.** A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 93(16):8455-9 (1996).
- Klein WL, Krafft GA, Finch CE.** Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends in Neurosciences*. 24(4):219-24 (2001).
- Klink R, Alonso A.** Morphological characteristics of layer II projection neurons in the rat medial entorhinal cortex. *Hippocampus*. 7(5):571-83 (1997).
- Kloosterman F, Witter MP, Van Haeften T.** Topographical and laminar organization of subicular projections to the parahippocampal region of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*. 455(2):156-71 (2003).
- Kluge C, Stoppel C, Szinyei C, Stork O, Pape HC.** Role of the somatostatin system in contextual fear memory and hippocampal synaptic plasticity. *Learning and Memory*. 15(4):252-60 (2008).
- Knuesel I, Nyffeler M, Mormede C, Muhia M, Meyer U, Pietropaolo S, Yee BK, Pryce CR, LaFerla FM, Marighetto A, Feldon J.** Age-related accumulation of Reelin in amyloid-like deposits. *Neurobiology of Aging*. 30(5):697-716 (2007).
- Koenigsknecht-Talboo J, Landreth GE.** Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid and IgGs are differentially regulated by proinflammatory cytokines. *The Journal of Neuroscience*. 25(36):8240-9 (2005).
- Koganezawa N, Taguchi A, Tominaga T, Ohara S, Tsutsui K, Witter MP, Iijima T.** Significance of the deep layers of entorhinal cortex for transfer of both perirhinal and amygdala inputs to the hippocampus. *Neuroscience Research*. 61(2):172-81 (2008).
- Kohler C, Chan-Palay.** Somatostatin and vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactive cells and terminals in the retrohippocampal region of the rat brain. *Anatomy and Embryology*. 167(2):151-72 (1983).
- Kohler C, Wu JY, Chan-Palay.** Neurons and terminals in the retrohippocampal region in the rat's brain identified by anti-gamma-aminobutyric acid and anti-glutamic acid decarboxylase immunocytochemistry. *Anatomy and Embryology*. 173(1):35-44 (1985).

Bibliografía

- Kohler C.** Intrinsic connections of the retrohippocampal region in the rat brain. II. The medial entorhinal area. *The Journal of Comparative Neurology*. 246(2):149-69 (1986).
- Kohler C, Eriksson L, Davies S, Chan-Palay V.** Neuropeptide Y innervation of the hippocampal region in the rat and monkey brain. *The Journal of Comparative Neurology*. 244(3):384-400 (1986).
- Kojro E, Gimpl G, Lammich S, Marz W, Fahrenholz F.** Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha-secretase ADAM 10. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*. 98(10):5815-20 (2001).
- Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K.** Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*. 441(7095):880-4 (2006).
- Kordower JH, Chu Y, Stebbins GT, DeKosky ST, Cochran EJ, Bennett D, Mufson EJ.** Loss and atrophy of layer II entorhinal cortex in elderly people with mild cognitive impairment. *Annals of Neurology*. 49(2):202-13 (2001).
- Kowall NW, Beal MF.** Cortical somatostatin, neuropeptide Y, and NADPH diaphorase neurons: normal anatomy and alterations in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*. 23(2):105-14 (1988).
- Kraepelin E.** Em Lehrbuch für Studierende und Ärzte. *Psychiatrie*. 593-632 (1910).
- Krall WJ, Sramer JJ, Cutler NR.** Cholinesterase inhibitors: a therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *The Annals of Pharmacotherapy*. 33(4):441-50 (1999).
- Kubota Y, Hattori R, Yui Y.** Three distinct subpopulations of GABAergic neurons in rat frontal agranular cortex. *Brain Research*. 649(1-2):159-73 (1994).
- Kubota Y, Kawaguchi Y.** Three classes of GABAergic interneurons in neocortex and neostriatum. *The Japanese Journal of Physiology*. 44 Suppl 2:S145-8 (1994).
- Kubota Y, Kawaguchi Y.** Two distinct subgroups of cholecystokinin-immunoreactive cortical interneurons. *Brain Research*. 752(1-2):175-83 (1997).
- Kumar SS, Buckmaster PS.** Hyperexcitability, interneurons, and loss of GABAergic synapses in entorhinal cortex in a model of temporal lobe epilepsy. *The Journal of Neuroscience*. 26(17):4613-23 (2006).
- Kumar U.** Expression of somatostatin receptor subtypes (SSTR1-5) in Alzheimer's disease brain: an immunohistochemical analysis. *Neuroscience*. 134(2):525-38 (2005).
- Kurt MA, Davies DC, Kidd M.** Beta-Amyloid immunoreactivity in astrocytes in Alzheimer's disease brain biopsies: an electron microscope study. *Experimental Neurology*. 158(1):221-8 (1999).
- LaFerla FM, Green KN, Oddo S.** Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 8:499-509 (2007).
- Lambert C, Desbarats J, Arbour N, Hall JA, Olivier A, Bar-Or A, Antel JP.** Dendritic cell differentiation signals induce anti-inflammatory properties in human adult microglia. *Journal of Immunology*. 181(12):8288-97 (2008).
- 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.** Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 95(11):6448-53 (1998).
- Lambert MP, Velasco PT, Chang L, Viola KL, Fernandez S, Lacor PN, Khuon D, Gong Y, Bigio EH, Shaw P, De Felice FG, Krafft GA, Klein WL.** Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of A β . *Journal of Neurochemistry*. 100(1):23-35 (2007).
- Lavenex P, Amaral DG.** Hippocampal-neocortical interaction: a hierarchy of associativity. *Hippocampus*. 10(4):420-30 (2000).
- Lazarov O, Lee M, Peterson DA, Sisodia SS.** Evidence that synaptically released beta-amyloid accumulates as extracellular deposits in the hippocampus of transgenic mice. *The Journal of Neuroscience*. 22(22):9785-93 (2002).
- Lazarov O, Peterson LD, Peterson DA, Sisodia SS.** Expression of familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 variant enhances perforant pathway lesion-induced neuronal loss in the entorhinal cortex. *The Journal of Neuroscience*. 26(2):429-34 (2006).
- Lazarov O, Morfini GA, Pigino G, Gadadhar A, Chen X, Robinson J, Ho H, Brady ST, Sisodia SS.** Impairments in fast axonal transport and motor neuron deficits in transgenic mice expressing familial Alzheimer's disease-linked mutant presenilin 1. *The Journal of Neuroscience*. 27(26):7011-20 (2007).

- Lee KW, Im JY, Song JS, Lee SH, Lee HJ, Ha HY, Koh JY, Gwag BJ, Yang SD, Paik SG, Han PL.** Progressive neuronal loss and behavioural impairments of transgenic C57BL/6 inbred mice expressing the carboxy terminus of amyloid precursor protein. *Neurobiology of Disease*. 22:10-24 (2006).
- Lee MK, Slunt HH, Martin LJ, Thinakaran G, Kim G, Gandy SE, Seeger M, Koo E, Price DL, Sisodia SS.** Expression of presenilin 1 and 2 (PS1 and PS2) in human and murine tissues. *The Journal of Neuroscience*. 16(23):7513-25 (1996).
- Lee SC, Dickson DW, Liu W, Brosnan CF.** Induction of nitric oxide synthase activity in human astrocytes by interleukin-1 beta and interferon-gamma. *Journal of Neuroimmunology*. 46(1-2):19-24 (1993).
- Lee VMY, Goedert M, Trojanowski Q.** Neurodegenerative tauopathies. *Annual Review of Neuroscience*. 24:1121-159 (2001).
- Lesné S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH.** A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*. 440(7082):284-5 (2006).
- Leuba G, Kraftsik R, Saini K.** Quantitative distribution of parvalbumin, calretinin, and calbindin D-28k immunoreactive neurons in the visual cortex of normal and Alzheimer cases. *Experimental Neurology*. 152(2):278-91 (1998).
- Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, Yen SH, Sahara N, Skipper L, Yager D, Eckman C, Hardy J, Hutton M, McGowan E.** Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science*. 293(5534):1487-91 (2001).
- Li M, Chen L, Lee DH, Zhang Y.** The role of intracellular amyloid beta in Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*. 83(3):131-9 (2007).
- Li X, Bijur GN, Jope RS.** Glycogen synthase kinase-3beta, mood stabilizers, and neuroprotection. *Bipolar Disorders*. 4(2):137-44 (2002).
- Lingenhöhl K, Finch DM.** Morphological characterization of rat entorhinal neurons in vivo: soma-dendritic structure and axonal domains. *Experimental Brain Research*. 84(1):57-74 (1991).
- Lippa CF, Hamos JE, Pulaski-Salo D, DeGennaro LJ, Drachman DA.** Alzheimer's disease and aging: effects on perforant pathway perikarya and synapses. *Neurobiology of Aging*. 13(3):405-11 (1992).
- Liu G, Huang W, Moir RD, Vanderburg CR, Lai B, Peng Z, Tanzi RE, Rogers JT, Huang X.** Metal exposure and Alzheimer's pathogenesis. *Journal of Structural Biology*. 155:45-51 (2006).
- Lopez JR, Lyckman A, Oddo S, LaFerla FM, Querfurth HW, Shtifman A.** Increased intraneuronal resting [Ca²⁺] in adult Alzheimer's disease mice. *Journal of Neurochemistry*. 105(1):262-71 (2008).
- Lotstra F, Vanderhaeghen JJ.** Distribution of immunoreactive cholecystokinin in the human hippocampus. *Peptides*. 8(5):911-20 (1987).
- Lu T, Pan Y, Kao SY, Kohane I, Chan J, Yankner BA.** Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature*. 429(6994):883-91 (2004).
- Lue LF, Brachova L, Civin WH, Rogers J.** Inflammation, A beta deposition, and neurofibrillary tangle formation as correlates of Alzheimer's disease neurodegeneration. *The Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 55(10):1083-8 (1996).
- Luo Y, Bolon B, Kahn S, Bennett BD, Babu-Khan S, Denis P, Fan W, Kha H, Zhang J, Gong Y, Martin L, Louis JC, Yan Q, Richards WG, Citron M, Vassar R.** Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nature Neuroscience*. 4(3):231-2 (2001).
- Ma Y, Hu H, Berrebi AS, Mathers PH, Agmon A.** Distinct subtypes of somatostatin-containing neocortical interneurons revealed in transgenic mice. *The Journal of Neuroscience*. 26(19):5069-82 (2006).
- Maccioni RB, Muñoz JP, Barbeito L.** The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Archives of Medical Research*. 32(5):367-81 (2001).
- Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y.** Apolipoprotein E4: A causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 103(15):5644-5651 (2006).
- Mahley RW, Huang Y, Weisgraber KH.** Detrimental effects of apolipoprotein E4: potential therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*. 4(5):537-40 (2007).
- Mai L, Jope RS, Li X.** BDNF-mediated signal transduction is modulated by GSK3beta and mood stabilizing agents. *Journal of Neurochemistry*. 82(1):75-83 (2002).

Bibliografía

- Malm TM, Koistinaho M, Parepalo M, Vatanen T, Ooka A, Karlsson S, Koistinaho J.** Bone-marrow-derived cells contribute to the recruitment of microglial cells in response to beta-amyloid deposition in APP/PS1 double transgenic Alzheimer mice. *Neurobiology of Disease*. 18(1):134-42 (2005).
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C.** Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature Reviews Neuroscience*. 5(10):793-807 (2004).
- Martins IC, Kuperstein I, Wilkinson H, Maes E, Vanbrabant M, Jonckheere W, Van Gelder P, Hartmann D, D'Hooge R, De Strooper B, Schymkowitz J, Rousseau F.** Lipids revert inert Abeta amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice. *The EMBO Journal*. 27(1):224-33 (2008).
- Martins IJ, Hone E, Foster JK, Sünram-Lea SI, Gnjec A, Fuller SJ, Nolan D, Gandy SE, Martins RN.** Apolipoprotein E, cholesterol metabolism, diabetes, and the convergence of risk factors for Alzheimer's disease and cardiovascular disease. *Molecular Psychiatry*. 11(8):721-36 (2006).
- Masliah E, Sisk A, Mallory M, Mucke L, Schenk D, Games D.** Comparison of neurodegenerative pathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein and Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience*. 16(18):5795-811 (1996).
- Matsuoka N, Yamazaki M, Yamaguchi I.** Changes in brain somatostatin in memory-deficient rats: comparison with cholinergic markers. *Neuroscience*. 66(3):617-26 (1995).
- Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE.** Beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *The Journal of Neuroscience*. 12(2):376-89 (1992).
- Mattson MP, Cheng B, Culwell AR, Esch FS, Lieberburg I, Rydel RE.** Evidence for excitoprotective and interneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron*. 10(2):243-54 (1993).
- Mattson MP.** Calcium and neuronal injury in Alzheimer's disease. Contributions of beta-amyloid precursor protein mismetabolism, free radicals, and metabolic compromise. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 747:50-76 (1994).
- Mattson MP, Chan SL.** Dysregulation of cellular calcium homeostasis in Alzheimer's disease: bad genes and bad habits. *Journal of Molecular Neuroscience*. 17(2):205-24 (2001).
- Mattson MP, Magnus T.** Ageing and neuronal vulnerability. *Nature Reviews Neuroscience*. 7(4):278-94 (2006).
- Mazurek MF, Beal MF.** Cholecystokinin and somatostatin in Alzheimer's disease postmortem cerebral cortex. *Neurology*. 41(5):716-9 (1991).
- McCormick DA, Connors BW, Lighthall JW, Prince DA.** Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. *Journal of Neurophysiology*. 54(4):782-806 (1985).
- McGeer PL, McGeer EG.** The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Research Reviews*. 21(2):195-218 (1995).
- McGeer PL, McGeer EG.** Polymorphisms in inflammatory genes and the risk of Alzheimer disease. *Archives of Neurology*. 58(11):1790-2 (2001).
- McGeer PL, McGeer EG.** NSAIDs and Alzheimer disease: epidemiological, animal model and clinical. *Neurobiology of Aging*. 28(5):639-47 (2007).
- McGowan E, Eriksen J, Hutton M.** A decade of modeling Alzheimer's disease in transgenic mice. *Trends in Genetics*. 22(5):281-9 (2006).
- Medeiros R, Prediger RD, Passos GF, Pandolfo P, Duarte FS, Franco JL, Dafre AL, Di Giunta G, Figueiredo CP, Takahashi RN, Campos MM, Calixto JB.** Connecting TNF-alpha signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid beta protein. *The Journal of Neuroscience*. 27(20):5394-404 (2007).
- Mena MA, Garcia de Yebenes J.** Glial cells as players in parkinsonism: the "good," the "bad," and the "mysterious" glia. *The Neuroscientist*. 14(6):544-60 (2008).
- Mescher MF, Agarwal P, Casey KA, Hammerbeck CD, Xiao Z, Curtsinger JM.** Molecular basis for checkpoints in the CD8 T cell response: tolerance versus activation. *Seminars in Immunology*. 19(3):153-61 (2007).
- Meunier M, Bachevalier J, Mishkin M, Murray EA.** Effects on visual recognition of combined and separate ablations of the entorhinal and perirhinal cortex in rhesus monkeys. *The Journal of Neuroscience*. 13(12):5418-32 (1993).
- 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.** Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature*. 451(7179):720-4 (2008).

- Miettinen M, Pitkanen A, Miettinen R.** Distribution of calretinin-immunoreactivity in the rat entorhinal cortex: coexistence with GABA. *The Journal of Comparative Neurology*. 378(3):363-78 (1997).
- Miettinen R, Riedel A, Kalesnykas G, Kettunen HP, Puolivali J, Soininen H, Arendt T.** Reelin-immunoreactivity in the hippocampal formation of 9-month-old wildtype mouse: effects of APP/PS1 genotype and ovariectomy. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 30(2-3):105-18 (2005).
- Mikkonen M, Soininen H, Pitkanen A.** Distribution of parvalbumin-, calretinin-, and calbindin-D28k-immunoreactive neurons and fibers in the human entorhinal cortex. *The Journal of Comparative Neurology*. 388(1):64-88 (1997).
- Mingam R, De Smedt V, Amedee T, Bluth RM, Kelley KW, Dantzer R, Laye S.** In vitro and in vivo evidence for a role of the P2X7 receptor in the release of IL-1 beta in the murine brain. *Brain, Behavior, and Immunity*. 22(2):234-44 (2008).
- Miyoshi G, Butt SJ, Takebayashi H, Fishell G.** Physiologically distinct temporal cohorts of cortical interneurons arise from telencephalic Olig2-expressing precursors. *The Journal of Neuroscience*. 27(29):7786-98 (2007).
- Mizutani T, Kasahara M.** Hippocampal atrophy secondary to entorhinal cortical degeneration in Alzheimer-type dementia. *Neuroscience Letters*. 222(2):119-22 (1997).
- Mochizuki A, Tamaoka A, Shimohata A, Komatsuzaki Y, Shoji S.** Abeta42-positive non-pyramidal neurons around amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Lancet*. 355(9197):42-3 (2000).
- Monif A, Reid CA, Powell KL, Smart ML, Williams DA.** The P2X7 receptor drives microglial activation and proliferation: a trophic role for P2X7R pore. *The Journal of Neuroscience*. 29(12):3781-91 (2009).
- Moolman DI, Vitolo OV, Vonsattel JP, Shelanski ML.** Dendrite and dendritic spine alterations in Alzheimer models. *Journal of Neurocytology*. 33(3):377-87 (2004).
- Mora A, Gonzalez-Polo RA, Fuentes JM, Soler G, Centeno F.** Different mechanisms of protection against apoptosis by valproate and Li+. *European Journal of Neurochemistry*. 266(3):886-91 (1999).
- Mora A, Sabio G, Risco AM, Cuenda A, Alonso JC, Soler G, Centeno F.** Lithium blocks the PKB and GSK3 dephosphorylation induced by ceramide through protein phosphatase-2A. *Cellular Signalling*. 14(6):557-62 (2002).
- Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, del Rio JC, Torres M, Romero-Acebal M, Ruano D, Vizuite M, Vitorica J, Gutierrez A.** Extracellular A β and cytotoxic glial activation induce significant entorhinal neuron loss in young PS1M146L/APP751SL mice. *Journal of Alzheimer's Disease*. In press (2009).
- Mori C, Spooner ET, Wisniewsk KE, Wisniewski TM, Yamaguchi H, Saido TC, Tolan DR, Selkoe DJ, Lemere CA.** Intraneuronal Abeta42 accumulation in Down syndrome brain. *Amyloid*. 9(2):88-102 (2002).
- Morishima-Kawashima M, Ihara Y.** Alzheimer's disease: beta-Amyloid protein and tau. *Journal of Neuroscience Research*. 70(3):392-401 (2002).
- Morrison JH, Rogers J, Scherr S, Benoit R, Bloom FE.** Somatostatin immunoreactivity in neuritic plaques of Alzheimer's patients. *Nature*. 314(6006):90-2 (1985).
- Morrison JH, Hof PR.** Life and death of neurons in the aging brain. *Science*. 278(5337):412-9 (1997).
- Morrisette DA, Parachikova A, Green KN, LaFerla FM.** Relevance of transgenic mouse models to human Alzheimer disease. *The Journal of Biological Chemistry*. 284(10):6033-7 (2009).
- Morys J, Sadowski M, Barcikowska M, Maciejewska B, Narkiewicz O.** The second layer neurones of the entorhinal cortex and the perforant path in physiological ageing and Alzheimer's disease. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 54(1):47-53 (1994).
- Mrak RE, Griffin ST.** Interleukin-1, neuroinflammation, and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 22(6):903-8 (2001).
- Mrak RE, Griffin ST.** Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration. *Neurobiology of Aging*. 26(3):349-54 (2005).
- Mrak RE, Griffin ST.** Common inflammatory mechanisms in Lewy body disease and Alzheimer's disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 66(8):683-6 (2007).
- Mufson EJ, Ginsberg SD, Ikonomovic MD, DeKosky ST.** Human cholinergic basal forebrain: chemoanatomy and neurologic dysfunction. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 26(4):233-42 (2003).
- Mullan M.** Familial Alzheimer's disease: second gene locus located. *British Medical Journal*. 305(6862):1108-9 (1992).

Bibliografía

- Muramori F, Kobayashi K, Nakamura I.** A quantitative study of neurofibrillary tangles, senile plaques and astrocytes in the hippocampal subdivisions and entorhinal cortex in Alzheimer's disease, normal controls and non-Alzheimer neuropsychiatric diseases. *Psychiatry and Clinical Neuroscience*. 52(6):593-9 (1998).
- Nag S, Yee BK, Tang F.** Chronic intracerebroventricular infusion of beta-amyloid (1-40) results in a selective loss of neuropeptides in addition to a reduction in choline acetyltransferase activity in the cortical mantle and hippocampus in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 897:420-2 (1999).
- Nagele RG, D'Andrea MR, Lee H, Venkataraman V, Wang HY.** Astrocytes accumulate A beta 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. *Brain Research*. 971(2):197-209 (2003).
- Nagele RG, Wegiel J, Venkataraman V, Imaki H, Wang KC, Wegiel J.** Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 25(5):663-74 (2004).
- Nakamura S, Vincent SR.** Somatostatin- and neuropeptide Y-immunoreactive neurons in the neocortex in senile dementia of Alzheimer's type. *Brain Research*. 370(1):11-20 (1986).
- Nakashima H, Ishihara T, Suquimoto P, Yokota O, Oshima E, Kugo A, Terada S, Hamamura T, Trojanowski JQ, Lee VM, Kurida S.** Chronic lithium treatment decreases tau lesions by promoting ubiquitination in a mouse model of tauopathies. *Acta Neuropathologica*. 110(6):547-56 (2005).
- Niederborn JY.** Emerging concepts in CD8(+) T regulatory cells. *Current Opinion in Immunology*. 20(3):327-31 (2008).
- Nilsson CL, Brinkmalm A, Minthon L, Blennow K, Ekman R.** Processing of neuropeptide Y, galanin, and somatostatin in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Peptides*. 22(12):2105-12 (2001).
- Nishitomi K, Sakaguchi G, Horikoshi Y, Gray AJ, Maeda M, Hirata-Fukae C, Becker AG, Hosono M, Sakaguchi I, Minami SS, Nakajima Y, Li HF, Takeyama C, Kihara T, Ota A, Wong PC, Aisen PS, Kato A, Kinoshita N, Matsuoka Y.** BACE1 inhibition reduces endogenous Abeta and alters APP processing in wild-type mice. *Journal of Neurochemistry*. 99(6): 1555-63 (2006).
- Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, Cuervo AM.** Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 64(2):113-22 (2005).
- Nixon RA.** Autophagy in neurodegenerative disease: friend, foe or turncoat? *Trends in Neurosciences*. 29(9):528-35 (2006).
- Nixon RA.** Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *Journal of Cell Science*. 120(Pt 23):4081-91 (2007).
- 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, Duff K.** Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 102(19):6990-5 (2005).
- Nocjar C, Hammonds MD, Shim SS.** Chronic lithium treatment magnifies learning in rats. *Neuroscience*. 150(4):774-88 (2007).
- Nunomura A, Castellani RJ, Zhu X, Moreira PI, Perry G, Smith MA.** Involvement of Oxidative Stress in Alzheimer Disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 65(7):631-41 (2006).
- Nyiri G, Stephenson FA, Freund TF, Somogy P.** 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(2):347-63 (2003).
- Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van Eldik L, Berry R, Vassar R.** Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *The Journal of Neuroscience*. 26(40):10129-40 (2006).
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM.** Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*. 39(3):409-21 (2003).
- Oddo S, Billings L, Kesslak JP, Cribbs DH, LaFerla FM.** Abeta immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome. *Neuron*. 43(3):321-32 (2005).
- Oddo S, Caccamo A, Cheng D, Juleh B, Torp R, LaFerla FM.** Genetically augmenting tau levels does not modulate the onset or progression of Abeta pathology in transgenic mice. *Journal of Neurochemistry*. 102(4):1053-63 (2007).

- O'Donnell T, Rotzinger S, Nakashima TT, Hanstock CC, Ulrich M, Sivelstone PH.** Chronic lithium and sodium valproate both decrease the concentration of myo-inositol and increase the concentration of inositol monophosphates in rat brain. *Brain Research*. 880(1-2):84-91 (2000).
- Ozaki N, Chuang DM.** Lithium increases transcription factor binding to AP-1 and cyclic AMP-responsive element in cultured neurons and rat brain. *Journal of Neurochemistry*. 69(6):2336-44 (1997).
- Papadopoulos GC, Parnavelas JG, Cavanagh ME.** Extensive co-existence of neuropeptides in the rat visual cortex. *Brain Research*. 420(1):95-9 (1987).
- Park CH, Carboni E, Wood PL, Gee KW.** Characterization of peripheral benzodiazepine type sites in a cultured murine BV-2 microglial cell line. *Glia*. 16(1):65-70 (1996).
- Paulson JB, Ramsden M, Forster C, Sherman MA, McGowan E, Ashe KH.** Amyloid plaque and neurofibrillary tangle pathology in a regulatable mouse model of Alzheimer's disease. *The American Journal of Pathology*. 173(3):762-72 (2008).
- Pearson RC, Esiri MM, Hiorns RW, Wilcock GK, Powell TP.** Anatomical correlates of the distribution of the pathological changes in the neocortex in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 82(13):4531-4 (1991).
- Pennanen C, Kivipelto M, Tuomainen S, Hartikainen P, Hänninen T, Laakso MP, Hallikainen M, Vanhanen M, Nissinen A, Helkala EL, Vainio P, Vanninen R, Partanen K, Soininen H.** Hippocampus and entorhinal cortex in mild cognitive impairment and early AD. *Neurobiology of Aging*. 25(3):303-10 (2004).
- Perry RT, Collins JS, Wiener H, Acton R, Go RC.** The role of TNF and its receptors in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 22(6):873-83 (2001).
- Pertusa M, Garcia-Matas S, Rodriguez-Farre E, Sanfeliu C, Cristofol R.** Astrocytes aged in vitro show a decreased neuroprotective capacity. *Journal of Neurochemistry*. 101(3):794-805 (2007).
- Pesold C, Impagnatiello F, Pisu MG, Uzunov DP, Costa E, Guidotti A, Caruncho HJ.** Reelin is preferentially expressed in neurons synthesizing gamma-aminobutyric acid in cortex and hippocampus of adult rats. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 95(6):3221-6 (1998).
- Petilla Interneuron Nomenclature Group, Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, Buzsáki G, Cauli B, Defelipe J, Fairén A, Feldmeyer D, Fishell G, Fregnac Y, Freund TF, Gardner D, Gardner EP, Goldberg JH, Helmstaedter M, Hestrin S, Karube F, Kisvárdy ZF, Lambolez B, Lewis DA, Marin O, Markram H, Muñoz A, Packer A, Petersen CC, Rockland KS, Rossier J, Rudy B, Somogyi P, Staiger JF, Tamas G, Thomson AM, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, West DC, Yuste R.** Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nature Neuroscience Reviews*. 9(7):557-68 (2008).
- Phelps ME.** PET: a biological imaging technique. *Neurochemical Research*. 16(9):929-40 (1991).
- Phelps ME.** Inaugural article: positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 97(16):9226-33 (2000).
- Phelps ME.** PET: the emerging of biology and imaging into molecular imaging. *Journal of Nuclear Medicine*. 41(4):661-81 (2000).
- Phiel CJ, Wilson CA, Lee VM, Klein PS.** GSK-3alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature*. 423(6938):435-9 (2003).
- Pickford F, Masliah E, Britschgi M, Lucin K, Narasimhan R, Jaeger PA, Small S, Spencer B, Rockenstein E, Levine B, Wyss-Coray T.** The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. 118(6):2190-9 (2008).
- Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW.** Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *The Journal of Neuroscience*. 13(4):1676-87 (1993).
- Pitkanen A, Pikkarainen M, Nurminen N, Ylinen A.** Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Annals of the New York Academy of Science*. 911:369-91 (2000).
- Porchet R, Probst A, Bouras C, Draberova E, Draber P, Riederer BM.** Analysis of glial acidic fibrillary protein in the human entorhinal cortex during aging and in Alzheimer's disease. *Proteomics*. 3(8):1476-85 (2003).
- Porter JT, Cauli B, Staiger JF, Lambolez B, Rossier J, Audinat E.** Properties of bipolar VIPergic interneurons and their excitation by pyramidal neurons in the rat neocortex. *The European Journal of Neuroscience*. 10(12):3617-28 (1998).
- Pothuizen HH, Feldon J, Jongen-Relo AL.** Co-expression of calretinin and gamma-aminobutyric acid in neurons of the entorhinal cortex of the common marmoset monkey. *Hippocampus*. 14(5):615-27 (2004).

Bibliografía

- Poucet B, Lenck-Santini PP, Paz-Villagran V, Save E.** Place cells, neocortex and spatial navigation: a short review. *Journal of Physiology*. 97(4-6):537-46 (2003).
- Price JL, Davis PB, Morris JC, White DL.** The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 12(4):295-312 (1991).
- Price JL, Ko AI, Wade MJ, Tsou SK, McKeel DW, Morris JC.** Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer disease. *Archives of Neurology*. 58(9):1395-402 (2001).
- Ralay Ranaivo H, Craft JM, Hu W, Guo L, Wing LK, Van Eldik LJ, Watterson DM.** Glia as a therapeutic target: selective suppression of human amyloid-beta-induced upregulation of brain proinflammatory cytokine production attenuates neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience*. 26(2):662-70 (2006).
- Ramos B, Baglietto-Vargas D, del Río JC, Moreno-González I, Santa-María C, Jiménez S, Caballero C, Lopez-Tellez JF, Khan ZU, Ruano D, Gutierrez A, Vitorica J.** Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1xAPP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 27(11):1658-72 (2006).
- Ray S, Britschgi M, Herbert C, Takeda-Uchimura Y, Boxer A, Blennow K, Friedman LF, Galasko DR, Jutel M, Karydas A, Kaye JA, Leszek J, Miller BL, Minthon L, Quinn JF, Rabinovici GD, Robinson WH, Sabbagh MN, So YT, Sparks DL, Tabaton M, Tinklenberg J, Yesavage JA, Tibshirani R, Wyss-Coray T.** Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signalling proteins. *Nature Medicine*. 13(11):1359-62 (2007).
- Re DB, Przedborski S.** Fractalkine: moving from chemotaxis to neuroprotection. *Nature Neuroscience*. 9(7):859-61 (2006).
- Regan C, Katona C, Walter Z, Hooper J, Donovan J, Livingston G.** Relationship of vascular risk to the progression of Alzheimer disease. *Neurology*. 67:1357-1362 (2006).
- Reiman EM, Caselli RJ.** Alzheimer's disease. *Maturitas*. 31(3):185-200 (1999).
- Reiner SA, Block GA, Morris JC, Liu G, Nessly ML, Lines CR, Norman BA, Baranak CC, Rofecoxib Protocol 091 Study Group.** Rofecoxib: no effect on Alzheimer's disease in a 1-year, randomized, blinded, controlled study. *Neurology*. 62(1):66-71 (2004).
- Reinikainen KJ, Riekkinen PJ, Jolkkonen J, Kosma VM, Soininen H.** Decreased somatostatin-like immunoreactivity in cerebral cortex and cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Brain Research*. 402(1):103-8 (1987).
- Reisberg B, Doody R, Stoffler A, Schmitt F, Ferris S, Mobius HJ, Memantine Study Group.** Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*. 348(14):1333-41 (2003).
- Ribe EM, Perez M, Puig B, Gich I, Lim F, Cuadrado M, Sesma T, Catena S, Snachez B, Nieto M, Gomez-Ramos P, Moran MA, Cabodevilla F, Samaranch L, Ortiz L, Perez A, Ferrer I, Avila J, Gomez-Isla T.** Accelerated amyloid deposition, neurofibrillary degeneration and neuronal loss in double mutant APP/tau transgenic mice. *Neurobiology of Disease*. 20:814-22 (2005).
- Richard KL, Filali M, Prefontaine P, Rivest S.** Toll-like receptor 2 acts as a natural innate immune receptor to clear amyloid beta 1-42 and delay the cognitive decline in a mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience*. 28(22):5784-93 (2008).
- Riedel A, Miettinen R, Stieler J, Mikkonen M, Alafuzoff I, Soininen H, Arendt T.** Reelin-immunoreactive Cajal-Retzius cells: the entorhinal cortex in normal aging and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*. 106(4):291-302 (2003).
- Rocchi A, Pellegrini S, Siciliano G, Murri L.** Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: a review. *Brain Research Bulletin*. 61:1-24 (2003).
- Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T, Mar L, Sorbi S, Nacmias B, Piacentini S, Amaducci L, Chumakov I, Cohen D, Lannfelt L, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH.** Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*. 376(6543):775-8 (1995).
- Rogers J, Lue LF.** Microglial chemotaxis, activation, and phagocytosis of amyloid beta-peptide as linked phenomena in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*. 39(5-6):333-40 (2001).
- Rojo LE, Fernandez JA, Maccioni AA, Jimenez JM, Maccioni RB.** Neuroinflammation: implications for the pathogenesis and molecular diagnosis of Alzheimer's disease. *Archives of Medical Research*. 39(1):1-16 (2008).
- Rosario ET, Pike CJ.** Androgen regulation of beta-amyloid protein and risk of Alzheimer's disease. *Brain Research Reviews*. 57(2):444-53 (2008).
- Rosengerg RN.** The molecular and genetic basis of AD: the end of the beginning: the 2000 Wartenberg lecture. *Neurology*. 54(11):2045-54 (2000).

- Rossor MN, Emson PC, Mountjoy CQ, Roth M, Iversen LL.** Reduced amounts of immunoreactive somatostatin in the temporal cortex in senile dementia of Alzheimer type. *Neuroscience Letters*. 20(3):373-7 (1980).
- Ruano D, Benavides J, Machado A, Vitorica J.** Aging-associated changes in the pharmacological properties of the benzodiazepine (omega) receptor isotypes in the rat hippocampus. *Journal of Neurochemistry*. 64(2):867-73 (1995).
- Rubinsztein DC, DiFiglia M, Heintz N, Nixon RA, Qin ZH, Ravikumar B, Stefanis L, Tolkovsky A.** Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair. *Autophagy*. 1(1):11-22 (2005).
- Ryder J, Su Y, Liu F, Li B, Zhou Y, Ni B.** Divergent roles of GSK3 and CDK5 in APP processing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 312(4):922-9 (2003).
- Ryoo SR, Cho HJ, Lee HW, Jeong HK, Radnaabazar C, Kim YS, Kim MJ, Son MY, Seo H, Chung SH, Song WJ.** Dual-specificity tyrosine(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A-mediated phosphorylation of amyloid precursor protein: evidence for a functional link between Down syndrome and Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*. 104:1333-44 (2008).
- Saito T, Takaki Y, Iwata N, Trojanowski J, Saido TC.** Alzheimer's disease, neuropeptides, neuropeptidase, and amyloid-beta peptide metabolism. *Science of Aging Knowledge Environment*. 2003(3):PE1 (2003).
- Saito T, Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Takano J, Huang SM, Suemoto T, Higuchi M, Saido TC.** Somatostatin regulates brain amyloid beta peptide Abeta42 through modulation of proteolytic degradation. *Nature Medicine*. 11(4):434-9 (2005).
- Sampson VL, Morrison JH, Vickers JC.** The cellular basis for the relative resistance of parvalbumin and calretinin immunoreactive neocortical neurons to the pathology of Alzheimer's disease. *Experimental Neurology*. 145(1):295-302 (1997).
- Santacruz K, Lewis J, Spire T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH.** Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science*. 309(5733):476-81 (2005).
- Sanz JM, Chiozzi P, Ferrari D, Colaianna M, Idzko M, Falzoni S, Fellin R, Trabace L, Di Virgilio F.** Activation of microglia by amyloid {beta} requires P2X7 receptor expression. *Journal of Immunology*. 182(7):4378-85 (2009).
- Sarkar S, Floto RA, Berger Z, Imarisio S, Cordenier A, Pasco M, Cook LJ, Rubinsztein DC.** Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *The Journal of Cell Biology*. 170(7):1101-11 (2005).
- Sarkar S, Rubinsztein DC.** Inositol and IP3 levels regulate autophagy: biology and therapeutic speculations. *Autophagy*. 2(2):132-4 (2006).
- Sarkar S, Davies JE, Haung Z, Tunnacliffe A, Rubinsztein DC.** Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *The Journal of Biological Chemistry*. 282(8):5641-52 (2007).
- Sarkar S, Krishna G, Imarisio S, Saiki S, O'Kane CJ, Rubinsztein DC.** A rational mechanism for combination treatment of Huntington's disease using lithium and rapamycin. *Human Molecular Genetics*. 17(2):170-8 (2008).
- Sasaki A, Yamaguchi H, Ogawa A, Sugihara S, Nakazato Y.** Microglial activation in early stages of amyloid beta protein deposition. *Acta Neuropathologica*. 94(4):316-22 (1997).
- Sastre M, Klockgether T, Heneka MT.** Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 24(2-3):167-76 (2006).
- Scharfman HE, Witter MP, Schwarcz R.** The parahippocampal region. Implications for neurological and psychiatric diseases. Introduction. *Annals of the New York Academy of Science*. 911:ix-xiii (2000).
- Scharfman HE.** The CA3 "backprojection" to the dentate gyrus. *Progress in Brain Research*. 163:627-37 (2007).
- Schettini G.** Brain somatostatin: receptor-coupled transducing mechanisms and role in cognitive functions. *Pharmacological Research*. 23(3):203-15 (1991).
- Scherzer CR, Landwehrmeyer GB, Kerner JA, Counihan TJ, Kosinski CM, Stanfaert DG, Daggett LP, Velicelebi G, Penney JB, Young AB.** Expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the human brain: hippocampus and cortex. *The Journal of Comparative Neurology*. 390(1):75-90 (1998).
- 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.** Hippocampal neuron loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *The American Journal of Pathology*. 164(4):1143-6 (2004).

Bibliografía

- Schwarcz R, Witter MP.** Memory impairment in temporal lobe epilepsy: the role of entorhinal lesions. *Epilepsy Research*. 50(1-2):161-77 (2002).
- Schwartz SP, Coleman PD.** Neurons of origin of the perforant path. *Experimental Neurology*. 74(1):305-12 (1981).
- Segura MF, Sole C, Oascual M, Moubarak RS, Perez-Garcia MJ, Gozzelino R, Iglesias V, Badiola N, Bayascas JR, Llecha N, Rodríguez-Alvarez J, Soriano E, Yuste VJ, Comella JX.** The long form of Fas apoptotic inhibitory molecule is expressed specifically in neurons and protects them against death receptor-triggered apoptosis. *The Journal of Neuroscience*. 27(42):11228-41 (2007).
- Selkoe DJ.** Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological Reviews*. 81(2):741-66 (2001).
- Selkoe DJ.** Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*. 298(5594):789-91 (2002).
- Selkoe DJ, Wolfe MS.** Presenilin: Running with scissors in the membrane. *Cell*. 131:215-21 (2007).
- Selkoe DJ.** Biochemistry and Molecular Biology of Amyloid beta-Protein and the Mechanism of Alzheimer's Disease. *Handbook of Clinical Neurology*. 89:245-60 (2008).
- Senut MC, Roudier M, Davous P, Fallet-Bianco C, Lamour Y.** Senile dementia of the Alzheimer type: is there a correlation between entorhinal cortex and dentate gyrus lesions? *Acta Neuropathologica*. 82(4):306-15 (1991).
- Sewards TV, Sewards MA.** Input and output stations of the entorhinal cortex: superficial vs. deep layers or lateral vs. medial divisions? *Brain Research Reviews*. 42(3):243-51 (2003).
- Shaftel SS, Griffin WS, O'Banion MK.** The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. *Journal of Neuroinflammation*. 5:7 (2008).
- Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL.** Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signalling pathway. *The Journal of Neuroscience*. 27(11):2866-75 (2007).
- Shaw M, Cohen P.** Role of protein kinase B and the MAP kinase cascade in mediating the EGF-dependent inhibition of glycogen synthase kinase 3 in Swiss 3T3 cells. *FEBS Letters*. 461(1-2):120-4 (1999).
- Shen J, Bronson RT, Chen DF, Xia W, Selkoe DJ, Tonegawa S.** Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice. *Cell*. 89(4):629-39 (1997).
- Sheng JG, Price DL, Koliatsos VE.** Disruption of corticocortical connections ameliorates amyloid burden in terminal fields in a transgenic model of Abeta amyloidosis. *The Journal of Neuroscience*. 22(22):9794-9 (2002).
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HAR, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH.** Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 375(6534):754-60 (1995).
- Silberberg G, Markram H.** Disynaptic inhibition between neocortical pyramidal cells mediated by Martinotti cells. *Neuron*. 53(5):735-46 (2007).
- Simard AR, Soulet D, Gowing G, Julien JP, Rivest S.** Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron*. 49(4):489-502 (2006).
- Simic G, Lucassen PJ, Krsnik Z, Kostovic I, Windblad B, Bogdanovic N.** nNOS expression in reactive astrocytes correlates with increased cell death related DNA damage in the hippocampus and entorhinal cortex in Alzheimer's disease. *Experimental Neurology*. 165(1):12-26 (2000).
- Small DH.** Network dysfunction in Alzheimer's disease: does synaptic scaling drive disease progression? *Trends in Molecular Medicine*. 14(3):103-8 (2008).
- Sobreviela T, Insausti A, Salinas A, Gonzalo LM, Insausti R.** The entorhinal cortex (hippocampal formation) in aging and Alzheimer's disease. Neuroanatomical interpretation. *Revista de Medicina de la Universidad de Navarra*. 41(1):19-27 (1997).
- Somia NV, Schmitt MJ, Vetter DE, Van Antwerp D, Heinemann SF, Verma IM.** LFG: an anti-apoptotic gene that provides protection from Fas-mediated cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 96(22):12667-72 (1999).
- Soriano E, Martinez A, Fariñas I, Frotscher M.** Chandelier cells in the hippocampal formation of the rat: the entorhinal area and subicular complex. *The Journal of Comparative Neurology*. 337(1):151-67 (1993).
- Squire LR, Zola-Morgan S.** The medial temporal lobe memory system. *Science*. 253(5026):1380-6 (1991).

- Standaert DG, Landwehrmeyer GB, Kerner JA, Penney JB Jr, Young AB.** Expression of NMDAR2D glutamate receptor subunit mRNA in neurochemically identified interneurons in the rat neostriatum, neocortex and hippocampus. *Molecular Brain Research*. 42(1):89-102 (1996).
- Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S.** Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *The Journal of Experimental Medicine*. 176(1):287-92 (1992).
- Stewart WF, Kawas C, Corrada M, Metter EJ.** Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use. *Neurology*. 48(3):626-32 (1997).
- Stichel CC, Luebbert H.** Inflammatory processes in the aging mouse brain: participation of dendritic cells and T-cells. *Neurobiology of Aging*. 28(10):1507-21 (2007).
- Stokin GB, Goldstein LS.** Axonal transport and Alzheimer's disease. *Annual Review of Biochemistry*. 75:607-27 (2006).
- Stoub TR, DeToledo-Morrell L, Stebbins GT, Leugans S, Bennett DA, Shah RC.** Hippocampal disconnection contributes to memory dysfunction in individuals at risk for Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 103(26):10041-5 (2006).
- Stoub TR, Rogalski EJ, Leurgans S, Bennet DA, De Toledo Morrell L.** Rate of entorhinal and hippocampal atrophy in incipient and mild AD: Relation to memory function. *Neurobiology of Aging*. Epub ahead of print (2008).
- Streit WJ.** Microglia and neuroprotection: implications for Alzheimer's disease. *Brain Research Reviews*. 48(2):234-9 (2005).
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD.** Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 90(5):1977-81 (1993).
- Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Bürki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B.** Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 94(24):13287-92 (1997).
- Su Y, Ryder J, Li B, Wu X, Fox N, Solenberg P, Brune K, Paul S, Zhou Y, Liu F, Ni B.** Lithium, a common drug for bipolar disorder treatment, regulates amyloid-beta precursor protein processing. *Biochemistry*. 43(22):6899-908 (2004).
- Suzuki K, Terry RD.** Fine structural localization of acid phosphatase in senile plaques in Alzheimer's presenile dementia. *Acta Neuropathologica*. 8(3):276-84 (1967).
- Suzuki WA, Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG.** Lesions of the perirhinal and parahippocampal cortices in the monkey produce long-lasting memory impairment in the visual and tactual modalities. *The Journal of Neuroscience*. 13(6):2430-51 (1993).
- Suzuki WA, Miller EK, Desimone R.** Object and place memory in the macaque entorhinal cortex. *Journal of Neurophysiology*. 78(2):1062-81 (1997).
- Swanson LW, Kohler C.** Anatomical evidence for direct projections from the entorhinal area to the entire cortical mantle in the rat. *The Journal of Neuroscience*. 6(10):3010-23 (1986).
- Szczepanik AM, Rampe D, Ringheim GE.** Amyloid-beta peptide fragments p3 and p4 induce pro-inflammatory cytokine and chemokine production in vitro and in vivo. *Journal of Neurochemistry*. 77(1):304-17 (2001).
- Tahvildari B, Alonso A.** Morphological and electrophysiological properties of lateral entorhinal cortex layers II and III principal neurons. *The Journal of Comparative Neurology*. (2005).
- Takahashi M, Yasutake K, Tomizawa K.** Lithium inhibits neurite growth and tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta-dependent phosphorylation of juvenile tau in cultured hippocampal neurons. *Journal of Neurochemistry*. 73(5):2073-83 (1999).
- Takeuchi A, Irizarry MC, Duff K, Saido TC, Ashe KH, Hasegawa M, Mann DMA.** Age-related amyloid β deposition in transgenic mice overexpressing both Alzheimer mutant presenilina 1 and amyloid β precursor protein Swedish mutant is not associated with global neuronal loss. *American Journal of Pathology*. 157(1):331-39 (2000).
- Tamamaki N, Nojyo Y.** Projection of the entorhinal layer II neurons in the rat as revealed by intracellular pressure-injection of neurobiotin. *Hippocampus*. 3(4):471-80 (1993).
- Tanzi RE.** The synaptic A β hypothesis of Alzheimer disease. *Nature Neuroscience*. 8:977-79 (2005).

Bibliografía

- Tamagno E, Guglielmotto M, Aragno M, Borghi R, Autelli R, Giliberto L, Muraca G, Danni O, Zhu X, Smith MA, Perry G, Jo DG, Mattson MP, Tabaton M.** Oxidative stress activates a positive feedback between the gamma- and beta-secretase cleavages of the b-amyloid precursor protein. *Journal of Neurochemistry*. 104(3):683-95 (2008).
- Tarkowski E, Blennow K, Wallin A, Tarkowski A.** Intracerebral production of tumor necrosis factor-alpha, a local neuroprotective agent, in Alzheimer disease and vascular dementia. *Journal of Clinical Immunology*. 19(4):223-30 (1999).
- Teipel SJ, Pruessner JC, Faltraco F, Born C, Rocha-Unold M, Evans A, Möller HJ, Hampel H.** Comprehensive dissection of the medial temporal lobe in AD: measurement of hippocampus, amygdala, entorhinal, perirhinal and parahippocampal cortices using MRI. *Journal of Neurology*. 253(6):794-800 (2006).
- Terry RD.** The pathogenesis of Alzheimer disease: an alternative to the amyloid hypothesis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 55(10):1023-5 (1996).
- Thal DR, Rub U, Schultz C, Sassin I, Ghebremedhin E, Del Tredici K, Braak E, Braak H.** Sequence of Abeta-protein deposition in the human medial temporal lobe. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 59(8):733-48 (2000).
- Thal DR, Rub U, Orantes M, Braak H.** Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*. 58(12):1791-800 (2002).
- Thinakaran G, Borchelt DR, Lee MK, Slunt HH, Spitzer L, Kim G, Ratovitsky T, Davenport F, Nordstedt C, Seeger M, Hardy J, Levey AI, Gandy SE, Jenkins NA, Copeland NG, Price DL, Sisodia SS.** Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron*. 17(1):181-90 (1996).
- Thomas DD, Ridnour LA, Isenberg JS, Flores-Santana W, Switzer CH, Donzelli S, Hussain P, Vecoli C, Paolocci N, Ambs S, Colton CA, Harris CC, Roberts DD, Wink DA.** The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signalling. *Free Radical Biology & Medicine*. 45(1):18-31 (2008).
- Thompson PM, Hayashi KM, de Zubicaray G, Janke AL, Rose SE, Semple J, Herman D, Hong MS, Dittmer SS, Doddrell DM, Toga AW.** Dynamics of gray matter loss in Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience*. 23(3):994-1005 (2003).
- Thorsell A, Michalkiewicz M, Dumont Y, Quirion R, Caberlotto L, Rimondini R, Mathe AA, Heilig M.** Behavioral insensitivity to restraint stress, absent fear suppression of behavior and impaired spatial learning in transgenic rats with hippocampal neuropeptide Y overexpression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 97(23):12852-7 (2000).
- Toledo-Rodriguez M, Goodman P, Illic M, Wu C, Markram H.** Neuropeptide and calcium-binding protein gene expression profiles predict neuronal anatomical type in the juvenile rat. *The Journal of Physiology*. 567(Pt 2):401-13 (2005).
- Tong N, Perry SW, Zhang Q, James HJ, Guo H, Brooks A, Bal H, Kinnear SA, Fine S, Epstein LG, Dairaghi D, Schall TJ, Gendelman HE, Dewhurst S, Sharer LR, Gelbard HA.** Neuronal fractalkine expression in HIV-1 encephalitis: roles for macrophage recruitment and neuroprotection in the central nervous system. *Journal of Immunology*. 164(3):1333-9 (2000).
- Torres-Aleman I.** Targeting insulin-like growth factor-1 to treat Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 11(12):1535-42 (2007).
- Town T, Laouar Y, Pittenger C, Mori T, Szekeley CA, Tan J, Duman RS, Flavell RA.** Blocking TGF-beta-Smad2/3 innate immune signaling mitigates Alzheimer-like pathology. *Nature Medicine*. 14(6):681-7 (2008).
- Tuñón T, Insausti R, Ferrer I, Sobreviela T, Soriano E.** Parvalbumin and calbindin D-28K in the human entorhinal cortex. An immunohistochemical study. *Brain Research*. 589(1):24-32 (1992).
- Tuppo EE, Arias HG.** The role of the inflammation in Alzheimer's disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 37(2):289-305 (2005).
- Turnbull E, MacPherson G.** Immunobiology of dendritic cells in the rat. *Immunological Reviews*. 184-68 (2001).
- Turner RS.** Alzheimer's disease in man and transgenic mice: females at higher risk. *The American Journal of Pathology*. 158(3):797-801 (2001).
- Uberti D, Ferrari-Toninelli G, Bonini SA, Sarnico I, Benarese M, Pizzi M, Benussi L, Ghidoni R, Binetti G, Spano P, Facchetti F, Memo M.** Blockade of the tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand death receptor DR5 prevents beta-amyloid neurotoxicity. *Neuropsychopharmacology*. 32(4):872-80 (2007).
- Urbanc B, Cruz L, Le R, Sanders J, Ashe KH, Duff K, Stanley HE, Irizarry MC, Hyman BT.** Neurotoxic effects of thioflavin S-positive amyloid deposits in transgenic mice and Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 99(22):13990-5 (2002).

- Van De Berg PJ, Van Leeuwen EM, Ten Berge IJ, Van Lier R.** Cytotoxic human CD4(+) T cells. *Current Opinion in Immunology*. 20(3):339-43 (2008).
- Van de Nes JA, Sabdmann-Keil D, Braak H.** Interstitial cells subjacent to the entorhinal region expressing somatostatin-28 immunoreactivity are susceptible to development of Alzheimer's disease-related cytoskeletal changes. *Acta Neuropathologica*. 104(4):351-6 (2002).
- Van der Wal EA, Gomez-Pinilla F, Cotman CW.** Transforming growth factor-beta 1 is in plaques in Alzheimer and Down pathologies. *Neuroreport*. 4(1):69-72 (1993).
- Van Gassen G, Annaert W.** Amyloid, presenilins and Alzheimer's disease. *The Neuroscientist*. 9(2):117-26 (2003).
- Van Groen T.** Entorhinal cortex of mouse: cytoarchitectonical organization. *Hippocampus*. 11:397-407 (2001).
- Van Groen T, Kadish I, Wyss JM.** Species differences in the projections from the entorhinal cortex to the hippocampus. *Brain Research Bulletin*. 57(3-4):553-6 (2002).
- Van Groen T, Miettinen P, Kadish I.** The entorhinal cortex of the mouse: organization of the projection to the hippocampal formation. *Hippocampus*. 13:133-49 (2003a).
- Van Groen T, Liu L, Ikonen S, Kadish I.** Diffuse amyloid deposition, but not plaque number, is reduced in amyloid precursor protein/presenilin 1 double-transgenic mice by pathway lesions. *Neuroscience*. 119(4):1185-97 (2003b).
- Van Haefen T, Wouterlood FG, Witter MP.** Presubicular input to the dendrites of layer-V entorhinal neurons in the rat. *Annals of the New York Academy of Science*. (2000).
- Van Haefen T, Baks-te-Bulte L, Goede PH, Wouterlood FG, Witter MP.** Morphological and numerical analysis of synaptic interactions between neurons in deep and superficial layers of the entorhinal cortex of the rat. *Hippocampus*. 13(8):943-52 (2003).
- Van Hoesen GW, Hyman BT, Damasio AR.** Entorhinal cortex pathology in Alzheimer's disease. *Hippocampus*. 1(1):1-8 (1991).
- Vecsei L, Klivenyi P.** Somatostatin and Alzheimer's disease. *Archives of Gerontology and Geriatrics*. 21(1):35-41 (1995).
- Vega MA, Corbi AL.** Human macrophage activation: Too many functions and phenotypes for a single cell type. *Immunologia*. 25(4):248-72 (2006).
- Vela J, Gutierrez A, Vitorica J, Ruano D.** Rat hippocampal GABAergic molecular markers are differentially affected by ageing. *The Journal of Neuroscience*. 85(2):368-77 (2003).
- Venneti S, Lopresti BJ, Wang G, Hamilton RL, Mathis CA, Klunk WE, Apte UM, Wiley CA.** PK11195 labels activated microglia in Alzheimer's disease and in vivo in a mouse model using PET. *Neurobiology of Aging*. Epub ahead of print (2008a).
- Venneti S, Wiley CA, Kofler J.** Imaging microglial activation during neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. Epub ahead of print (2008b).
- Vermersch P, Frigard B, David JP, Fallet-Bianco C, Delacourte A.** Presence of abnormally phosphorylated Tau proteins in the entorhinal cortex of aged non-demented subjects. *Neuroscience Letters*. 144(1-2):143-6 (1992).
- Vetrivel KS, Zhang YW, Xu H, Thinakaran G.** Pathological and physiological functions of presenilins. *Molecular Neurodegeneration*. 1:4 (2006).
- Vincent SR, Johansson O, Hokfelt T, Meyerson B, Sachs C, Elde RP, Terenius L, Kimmel J.** Neuropeptide coexistence in human cortical neurones. *Nature*. 298(5869):65-7 (1982).
- Wada A, Yokoo H, Yanagita T, Kobayashi H.** Lithium: potential therapeutics against acute brain injuries and chronic neurodegenerative diseases. *Journal of Pharmacological Science*. 99(4):307-21 (2005).
- Wahle P.** Differential regulation of substance P and somatostatin in Martinotti cells of the developing cat visual cortex. *The Journal of Comparative Neurology*. 329(4):519-38 (1993).
- Wakabayashi K, Honer WG, Masliah E.** Synapse alterations in the hippocampal-entorhinal formation in Alzheimer's disease with and without Lewy body disease. *Brain Research*. 667(1):24-32 (1994).
- Wallace MN, Geddes JG, Farquhar DA, Masson MR.** Nitric oxide synthase in reactive astrocytes adjacent to beta-amyloid plaques. *Experimental Neurology*. 144(2):266-72 (1997).
- Walsh DM, Lomakin A, Benedek GB, Maggio JE, Condron MM, Teplow DB.** Amyloid β -protein fibrillogenesis: Detection of a protofibrillar intermediate. *The Journal of Biological Chemistry*. 272(35):22364-74 (1997).

Bibliografía

- Walsh DM, Hartley DM, Kusumoto Y, Fezoui Y, Condron MM, Lomakin A, Benedek GB, Selkoe DJ, Teplow DB. Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *The Journal of Biological Chemistry*. 274(36):25945-52 (1999).
- Walsh DM, Tseng BP, Rydel RE, Podlisny MB, Selkoe DJ. The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry*. 39(35):10831-9 (2000).
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Rowan MJ, Selkoe DJ. Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition. *Biochemical Society Transactions*. 30(4):552-7 (2002).
- Walsh DM, Minogue AM, Sala Frigerio C, Fadeeva JV, Wasco W, Selkoe DJ. The APP family of proteins: similarities and differences. *Biochemical Society Transactions*. 35(2):416-20 (2007).
- Wang HY, Lee DH, D'Andrea MR, Peterson PA, Shank RP, Reitz AB. Beta-amyloid(1.42) bind to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *The Journal of Biological Chemistry*. 275(8):5626-32 (2000).
- Wang Y, Gupta A, Toledo-Rodriguez M, Wu CZ, Markram H. Anatomical, physiological, molecular and circuit properties of nest basket cells in the developing somatosensory cortex. *Cerebral Cortex*. 12(4):395-410 (2002).
- Wang Y, Toledo-Rodriguez M, Gupta A, Wu C, Silberberg G, Luo J, Markram H. Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat. *The Journal of Physiology*. 561(1):65-90 (2004).
- Webber KM, Casadesus G, Atwood CS, Bowen RL, Perry G, Smith MA. Gonadotropins: a cohesive gender-based etiology of Alzheimer disease. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 260-262:271-5 (2007).
- Wegiel J, Kuchna I, Nowicki K, Frackowiak J, Mazur-Kolecka B, Imaki H, Wegiel J, Mehta PD, Silverman WP, Reisberg B, Deleon M, Wisniewski T, Pirtilla T, Frey H, Lehtimäki T, Kivimäki T, Visser FE, Kamphorst W, Potempska A, Bolton D, Currie JR, Miller DL. Intraneuronal Abeta immunoreactivity is not a predictor of brain amyloidosis-beta or neurofibrillary degeneration. *Acta Neuropathologica*. 113(4):389-402 (2007).
- Weisman D, Hakimian E, Ho GJ. Interleukins, inflammation, and mechanisms of Alzheimer's disease. *Vitamins and Hormones*. 74:505-30 (2006).
- Weldon DT, Rogers SD, Ghilardi JR, Finke MP, Cleary JP, O'Hare E, Esler WP, Maggio JE, Mantyh PW. Fibrillar beta-amyloid induces microglial phagocytosis, expression of inducible nitric oxide synthase, and loss of a select population of neurons in the rat CNS in vivo. *The Journal of Neuroscience*. 18(6):2161-73 (1998).
- Wilcock DM, DiCarlo G, Henderson D, Jackson J, Clarke K, Igen KE, Gordon MN, Morgan D. Intracranially administered anti-Abeta antibodies reduce beta-amyloid deposition by mechanisms both independent of and associated with microglial activation. *The Journal of Neuroscience*. 23(9):3745-51 (2003).
- Wilcock DM, Rojiani A, Rosenthal A, Levkowitz G, Subbarao S, Alamed J, Wilson D, Wilson N, Freeman MJ, Gordon MN, Morgan D. Passive amyloid immunotherapy clears amyloid and transiently activates microglia in a transgenic mouse model of amyloid deposition. *The Journal of Neuroscience*. 24(27):6144-51 (2004a).
- Wilcock DM, Rojiani A, Rosenthal A, Subbarao S, Freeman MJ, Gordon MN, Morgan D. Passive immunotherapy against Abeta in aged APP-transgenic mice reverses cognitive deficits and depletes parenchymal amyloid deposits in spite of increased vascular amyloid and microhemorrhage. *Journal of Neuroinflammation*. 1(1):24 (2004b).
- Wilcock DM, Lewis MR, Van Nostrand WE, Davis J, Previti ML, Gharkholonarehe N, Vitek MP, Colton CA. Progression of amyloid pathology to Alzheimer's disease pathology in an amyloid precursor protein transgenic mouse model by removal of nitric oxide synthase 2. *The Journal of Neuroscience*. 28(7):1537-45 (2008).
- Willem M, Dewachter I, Smyth N, Van Dooren T, Borghgraef P, Haass C, Van Leuven F. Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 increases amyloid deposition in brain parenchyma but reduces cerebrovascular amyloid angiopathy in aging BACE x APP[V717I] double-transgenic mice. *The American Journal of Pathology*. 165(5):1621-31 (2004).
- Williams RS, Cheng L, Mudge AW, Harwood AJ. A common mechanism of action for three mood-stabilizing drugs. *Nature*. 417(6886):292-5 (2002).
- Wirths O, Multhaup G, Czech C, Blanchard V, Moussaoui S, Tremp G, Pradier L, Beyreuther K, Bayer TA. Intraneuronal Abeta accumulation precedes plaque formation in beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. *Neuroscience Letters*. 306(1-2):116-20 (2001).
- Wirths O, Multhaup G, Bayer TA. A modified b-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the b-amyloid peptide – the first step of a fatal cascade. *Journal of Neurochemistry*. 91:513-20 (2004).

- Wirths O, Weis J, Szczygielski J, Multhaup G, Bayer TA.** Axonopathy in an APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*. 111(4):312-9 (2006).
- Wirths O, Weis J, Kayed R, Saido TC, Bayer TA.** Age-dependent axonal degeneration in an Alzheimer mouse model. *Neurobiology of Aging*. 28(11):1689-99 (2007).
- Witter MP, Amaral DG.** Entorhinal cortex of the monkey: V. Projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex. *The Journal of Comparative Neurology*. 307(3):437-59 (1991).
- Witter MP, Naber PA, Van Haeften T, Machielsen WC, Rombouts SA, Barkhof F, Scheltens P, Lopes da Silva FH.** Cortico-hippocampal communication by way of parallel parahippocampal-subicular pathways. *Hippocampus*. 10(4):398-410 (2000a).
- Witter MP, Wouterlood FG, Naber PA, Van Haeften T.** Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network. *Annals of the New York Academy of Science*. 911:1-24 (2000b).
- Witter MP.** The perforant path: projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus. *Progress in Brain Research*. 163:43-61 (2007).
- Wojtterra M, Sikorska B, Sobow T, Liberski PP.** Microglial cells in neurodegenerative disorders. *Folia Neuropathologica*. 43(4):311-21 (2005).
- Wonders CP, Anderson SA.** The origin and specification of cortical interneurons. *Nature Reviews Neuroscience*. 7(9):687-96 (2006).
- Wouterlood FG, Hartig W, Bruckner G, Witter MP.** Parvalbumin-immunoreactive neurons in the entorhinal cortex of the rat: localization, morphology, connectivity and ultrastructure. *Journal of Neurocytology*. 24(2):135-53 (1995).
- Wouterlood FG, Pothuizen H.** Sparse colocalization of somatostatin- and GABA-immunoreactivity in the entorhinal cortex of the rat. *Hippocampus*. 10(1):77-86 (2000).
- Wouterlood FG, Van Denderen JC, Van Haeften T, Witter MP.** Calretinin in the entorhinal cortex of the rat: distribution, morphology, ultrastructure of neurons, and co-localization with gamma-aminobutyric acid and parvalbumin. *The Journal of Comparative Neurology*. 425(2):177-92 (2000).
- Wouterlood FG, Aliane V, Boekel AJ, Hur EE, Zaborszky L, Barroso-Chinea P, Hartig W, Lanciego JL, Witter MP.** Origin of calretinin-containing, vesicular glutamate transporter 2-coexpressing fiber terminals in the entorhinal cortex of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*. 506(2):359-70 (2008).
- Wyss-Coray T, Lin C, Yan F, Yu GQ, Rohde M, McConlogue L, Masliah E, Mucke L.** TGF-beta1 promotes microglial amyloid-beta clearance and reduces plaque burden in transgenic mice. *Nature Medicine*. 7(5):612-18 (2001).
- Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F, Silverstein SC, Husemann J.** Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nature Medicine*. 9(4):453-7 (2003).
- Wyss-Coray T.** Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nature Medicine*. 12(9):1005-15 (2006).
- Xu H, Gouras GK, Greenfield JP, Vincent B, Naslund J, Mazzarelli , Fried G, Jovanovic JN, Seeger M, Relkin NR, Liao F, Checler F, Buxbaum JD, Chait BT, Thinakaran G, Sisodia SS, Wang R, Greengard P, Gandy S.** Estrogen reduces neuronal generation of Alzheimer beta-amyloid peptides. *Nature Medicine*. 4(4):447-51 (1998).
- Xu Q, de la Cruz E, Anderson SA.** Cortical interneuron fate determination: diverse sources for distinct subtypes?. *Cerebral Cortex*. 13(6):670-6 (2003).
- Xu X, Roby KD, Callaway EM.** Mouse cortical inhibitory neuron type that coexpresses somatostatin and calretinin. *The Journal of Comparative Neurology*. 499(1):144-60 (2006).
- Yang DS, Kumar A, Stavrides P, Peterson J, Peterhoff CM, Pawlik M, Levy E, Cataldo AM, Nixon RA.** Neuronal apoptosis and autophagy cross talk in aging PS/APP mice, a model of Alzheimer's disease. *The American Journal of Pathology*. 173(3):665-81 (2008).
- Yanker BA.** Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuron*. 16(5):921-32 (1996).
- Yoshiyama Y, Higuchi M, Zhang B, Huang SM, Iwata N, Saido TC, Maeda J, Suhara T, Trojanowski JQ, Lee VM.** Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron*. 53(3):337-51 (2007).
- Yu WH, Cuervo AM, Kumar A, Peterhoff CM, Schmidt SD, Lee JH, Mohan PS, Mercken M, Farmary MR, Tjernberg LO, Jiang Y, Duff K, Uchiyama Y, Naslund J, Mathews PM, Cataldo AM, Nixon RA.** Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *The Journal of Cell Biology*. 171(1):87-98 (2005).

Bibliografía

- Yuan P, Chen G, Manji HK.** Lithium activates the c-Jun NH2-terminal kinases in vitro and in the CNS in vivo. *Journal of Neurochemistry*. 73(6):2299-309 (1999).
- Zhang J, Brys M, Glodzik L, Tsui W, Javier E, Wegiel J, Kuchna I, Pirraglia E, Li Y, Mosconi L, Saint Louis LA, Switalski R, De Santi S, Kim BC, Wisniewski T, Reisberg B, Bobinski M, De Leon MJ.** An entorhinal cortex sulcal pattern is associated with Alzheimer's disease. *Human Brain Mapping*. 30(3):874-82 (2009).
- Zhao M, Cribbs DH, Anderson AJ, Cummings BJ, Su JH, Wasserman AJ, Cotman CW.** The induction of the TNFalpha death domain signaling pathway in Alzheimer's disease brain. *Neurochemical Research*. 28(2):307-18 (2003).
- Zhao W, Xie W, Xiao Q, Beers DR, Appel SH.** Protective effects of an anti-inflammatory cytokine, interleukin-4, on motoneuron toxicity induced by activated microglia. *Journal of Neurochemistry*. 99(4):1176-87 (2006).
- Zhong J, Lee WH.** Lithium: a novel treatment for Alzheimer's disease? *Expert Opinion on Drug Safety*. 6(4):375-83 (2007).
- Zhu J, Paul WE.** CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 112(5):1557-69 (2008).
- Zhu X, Perry G, Smith MA.** Insulin signalling, diabetes mellitus and risk of Alzheimer disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 7(1):81-4 (2005).
- Zhu X, Sua B, Wanga X, Smith MA, Perry G.** Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 64:2202-10 (2007).
- Zigman WB, Lott IT.** Alzheimer's disease in Down syndrome: neurobiology and risk. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*. 13(3):237-46 (2007).
- Zipp F, Aktas O.** The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends in Neurosciences*. 29(9):518-27 (2006).
- Zola-Morgan S, Squire LR.** Medial temporal lesions in monkeys impair memory on a variety of tasks sensitive to human amnesia. *Behavioral Neuroscience*. 99(1):22-34 (1985).
- Zujovic V, Benavides J, Vige X, Carter C, Taupin V.** Fractalkine modulates TNF-alpha secretion and neurotoxicity induced by microglial activation. *Glia*. 29(4):305-15 (2000).